



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PISA

Facoltà di Medicina e Chirurgia
Dottorato in Fisiopatologia Medica e Farmacologia
Anno Accademico 2005-2006

Tesi di dottorato:

**“Analisi proteomica della saliva
in pazienti affetti da Sindrome di Sjogren primitiva”**

Relatore: Prof. Stefano Bombardieri

Candidato: Chiara Baldini

INDICE:

| | |
|--|-------------------|
| RIASSUNTO | pag. 3-4 |
| I. INTRODUZIONE | |
| Ia. SjS: aspetti epidemiologici, eziopatogenetici, clinici e diagnostici | pag. 5-16 |
| Ib. SjS: modificazioni qualitative e quantitative nella composizione della saliva | pag. 17-18 |
| Ic. La proteomica | pag. 19-26 |
| Id. Applicazioni cliniche dell'analisi proteomica allo studio della saliva | pag. 27-29 |
| II. SCOPO DEL LAVORO | pag. 30-31 |
| III. MATERIALI E METODI | |
| IIIa. Pazienti | pag. 32-33 |
| IIIb. Materiali e strumentazione | pag. 34 |
| IIIc. Raccolta e preparazione del campione | pag. 34-36 |
| IIId. Elettroforesi bidimensionale | pag. 36-42 |
| IIIe. MALDI-TOF | pag. 42-43 |
| IIIf. Analisi statistica | pag. 43 |
| IV RISULTATI | |
| IVa. Analisi dei gel sintetici | pag. 44-50 |
| IVb. Analisi quantitativa delle proteine di interesse | pag. 50-53 |
| V. DISCUSSIONE | pag. 54-57 |
| VI. CONCLUSIONI | pag. 58-59 |
| VII. BIBLIOGRAFIA | pag. 60-68 |
| ALLEGATI | pag. 69-80 |

RIASSUNTO

La Sindrome di Sjogren primitiva (SjS) è una malattia autoimmune sistemica a patogenesi multifattoriale che colpisce in maniera peculiare le ghiandole esocrine salivari e lacrimali. La flogosi cellulo-mediata determina una progressiva compromissione della funzione ghiandolare che si traduce, dal punto di vista clinico, in una tipica sindrome secca caratterizzata da secchezza orale e oculare persistenti.

Scopo del lavoro: considerando la peculiarità della SjS nel coinvolgimento diretto delle ghiandole salivari maggiori e minori, l'ipotesi di lavoro che ha guidato questo studio è stata quella di verificare se il fluido salivare dei pazienti potesse rispecchiare, nella composizione proteica, le alterazioni anatomico-funzionali determinate dalla malattia a livello del tessuto ghiandolare. Scopo del lavoro è stato, quindi, quello di caratterizzare mediante analisi proteomica il profilo proteico salivare di pazienti affetti da SjS e comparare il pattern ottenuto con quello di controlli sani e di un gruppo di controlli "patologici" al fine di identificare eventuali biomarkers di malattia.

Pazienti e metodi: Sono stati arruolati nello studio: 15 pazienti con diagnosi di SjS, formulata in accordo con i Criteri Internazionali validati per la diagnosi di malattia, 15 controlli sani e 30 "controlli patologici" comparabili per sesso ed età. Nell'ambito dei 30 controlli patologici: 15 soggetti risultavano affetti da Sclerodermia sistemica progressiva (malattia autoimmune sistemica in grado di determinare un impegno fibrotico non flogistico delle ghiandole salivari), 6 presentavano una Sindrome Sicca Idiopatica non immunomediata e, 9 soggetti risultavano asintomatici per quanto relativo alla secchezza delle mucose ma erano portatori di autoanticorpi patologici (anti Ro/SSA e anti La/SSB), altamente specifici per la SjS. La caratterizzazione del profilo proteico salivare è stata effettuata combinando l'elettroforesi bidimensionale con la spettrometria di massa (MALDI-TOF mass spectrometry). I campioni sono stati raccolti in condizioni standard, centrifugati a 14000 g per 20 minuti a 4°C per rimuovere materiale insolubile e cellule, opportunamente preparati, e sottoposti ad elettroforesi bidimensionale. La prima dimensione è stata effettuata su strip di 18 cm in cui è presente un gradiente lineare di pH 3-10. La seconda dimensione è stata effettuata su gel di poliacrilammide 12% (20cm×20cm×1,5mm). I gel analitici sono stati colorati mediante Silver staining, mentre i gel preparativi per la spettrometria di massa con il Blu Coomassie Colloidale. Le immagini dei gel sono state acquisite tramite uno scanner (Epson Expression 1680) e analizzate con il programma Image Master 2D Platinum 5.0 dell'Amersham Bioscience. Gli spot di interesse sono stati, infine, identificati mediante MALDI-TOF mass spectrometry.

L'analisi statistica è stata condotta mediante test ANOVA per il confronto delle medie tra più gruppi analizzati simultaneamente e mediante *t*-test per il confronto delle medie dei gruppi a due a due. Un p-value <0.05 è stato considerato statisticamente significativo.

Risultati: Lo studio ha permesso mettere in evidenza numerose differenze tra il pattern proteico salivare dei pazienti con SjS ed i profili proteici salivari dei soggetti sani e dei controlli patologici. In particolare, nei pazienti con SjS è stato possibile osservare una riduzione nei livelli di espressione di alcune tipiche proteine salivari acinari (albumina, α -amilasi salivare, PIP, cheratina 6L, anidrasi carbonicaVI), un'alterata espressione di proteine coinvolte nell'equilibrio proteasi / antiproteasi con una riduzione delle cistatine e dei loro precursori e un incremento dell'inibitore dell'elastasi leucocitaria, un incremento di proteine coinvolte nel danno tissutale (actina, lipocalina-1 precursore) e, infine, un'aumentata espressione di proteine infiammatorie e legate all'autoimmunità (calgranulina B, ciclofillina A, catena leggera κ delle immunoglobuline, beta2-microglobulina).

Conclusioni: Lo studio, seppure preliminare, ha permesso di documentare come il pattern proteico salivare dei pazienti con SjS risulti profondamente alterato e presenti aspetti peculiari che, in parte riflettono l'impegno flogistico selettivo da parte della malattia delle ghiandole salivari, in parte riflettono le alterazioni dell'ambiente orale che essa induce e, in parte, infine, la natura autoimmune sistemica della SjS. L'insieme delle alterazioni osservate suggerisce che il dosaggio dei livelli salivari di un numero limitato di proteine, identificate tramite analisi proteomica, possa costituire un valido ausilio nella diagnosi di malattia, configurando una sorta di algoritmo proteico da applicare soprattutto nei casi che rimangono dubbi nelle indagini di diagnostica tradizionale. Complessivamente, quindi, seppure a livello preliminare, lo studio ha mostrato come l'analisi proteomica di fluidi biologici scarsamente complessi e facilmente reperibili come la saliva possa rappresentare un'ulteriore ausilio nella diagnosi delle malattie reumatiche, in generale, e della SjS in particolare.

I.INTRODUZIONE

Ia. Sindrome di Sjogren: aspetti epidemiologici, eziopatogenetici, clinici e diagnostici

La sindrome di Sjogren (SjS) è una malattia autoimmune sistemica che colpisce caratteristicamente le ghiandole esocrine ed in particolare le ghiandole salivari e quelle lacrimali manifestandosi, clinicamente, con una sindrome secca oculare e orale che deriva dal coinvolgimento anatomico e funzionale delle ghiandole stesse (1).

Dal punto di vista nosografico la malattia può presentarsi in forma isolata (SjS idiopatica o primitiva), oppure in associazione ad altre malattie autoimmuni come l'Artrite Reumatoide, il Lupus Eritematoso Sistemico o la Sclerodermia: si parla in tal caso di SjS secondaria (2).

La SjS primitiva ha una distribuzione ubiquitaria e colpisce preferenzialmente soggetti di sesso femminile (rapporto femmine: maschi = 9:1) con un primo picco di incidenza nella II-III decade di vita ed un secondo picco in età post-menopausale, nella V decade di vita. I dati relativi alla prevalenza e all'incidenza di malattia sono estremamente discordanti e sono condizionati dai criteri classificativi utilizzati nei diversi studi epidemiologici; in tal senso, il tasso di prevalenza della SjS è stimato in un range variabile tra lo 0.15% e il 3.3%, mentre il tasso di incidenza varia da 1: 1000 a 1: 100 a seconda dei diversi studi in esame (3-6). Le discrepanze degli studi epidemiologici condotti sulla malattia possono, almeno in parte essere giustificate dal fatto che criteri classificativi per la SjS primitiva e secondaria, accettati a livello internazionale, sono stati elaborati solo recentemente, nell'ambito dell' American-European Consensus Group nel 2002 (7) (Tabella 1). Utilizzando tali criteri la prevalenza della malattia è stimata pari a circa lo 0.5% nella popolazione adulta (8).

Tabella 1: *American European Consensus Criteria 2002*

| |
|---|
| 1. Sintomi oculari Una risposta positiva almeno ad una delle seguenti domande: Ha sensazione quotidiana di occhi secchi da oltre tre mesi? Ha sensazione di sabbia/corpo estraneo negli occhi? Utilizza lacrime artificiali per più di tre volte al giorno? |
| 2. Sintomi orali Una risposta positiva almeno ad una delle seguenti domande: Ha sensazione quotidiana di bocca secca da oltre tre mesi? Ha tumefazione ricorrente o persistente delle ghiandole salivari? Deve bere molto per inghiottire cibi secchi? |
| 3. Segni Oculari Schirmer test (<5 mm in 5 min) Rosa Bengala positivo |
| 4. Istopatologia Focus score > 1 (Focus: aggregato di almeno 50 cellule mononucleate adiacente ad acino intatto, Focus score numero di foci per 4 mmq) |
| 5. Impegno delle ghiandole salivari Scintigrafia salivare Scialografia parotidea Riduzione del flusso salivare (< 1,5 ml in 15 min) |
| 6. Autoanticorpi Ro-SSA e/o La-SSB |

Per SjS primario:

- Presenza di 4 criteri su sei positivi di cui almeno uno sia rappresentato dall'istopatologia o dalla sierologia
- Presenza di 3 dei 4 criteri "obiettivi" (punti 3 ,4 ,5 ,6)

Per SjS secondario: criteri 1 e 2 + almeno due tra 3, 4 e 5

Criteri di esclusione: radioterapia, HCV, AIDS, linfoma pre-esistente, sarcoidosi, GVHD, uso di farmaci anticolinergici

Dal punto di vista eziopatogenetico la SjS è descritta come un processo sequenziale “multistep” di tipo multifattoriale che sembrerebbe originare dall’interazione tra fattori di predisposizione genetica e agenti esogeni ambientali in grado di innescare risposte autoimmunitarie abnormi, sia da parte dei linfociti T che dei linfociti B, rivolte contro auto-antigeni tissutali; tali risposte sarebbero in grado di sostenere, perpetuare e amplificare il danno tissutale portando ad uno stato infiammatorio cronico e ad una progressiva perdita funzionale degli organi colpiti (2). I fattori di predisposizione genetica suggeriti sono essenzialmente rappresentati dai geni del sistema maggiore di istocompatibilità (HLA). La SjS è, infatti, strettamente associata all’espressione dell’HLA-DR3 e dei geni ad esso correlati B8 e DQ2. Tale associazione è particolarmente forte per i soggetti con SjS che producono anticorpi anti-Ro/SSA (9). Oltre al sistema HLA gli studi più recenti hanno focalizzato l’attenzione su geni polimorfici che codificano per molecole coinvolte fisiologicamente nella risposta immunitaria come il gene dell’IL-10 (aplotipo GCC), il gene del TNF alfa (allele TNF-308A) e il gene della catena alfa del recettore dell’IL4. Altri polimorfismi genici sono stati osservati a carico del gene della lectina legante il mannosio e dei recettori di alcune chemochine, in particolare del recettore CCR5 che lega le chemochine chemoattrattanti delle cellule mononucleari CCL3, CCL4 e CCL5 (10). Anche gli agenti ambientali legati alla patogenesi della SjS sono molteplici ma, in primis, sono chiamati in causa fattori ormonali (ruolo protettivo degli androgeni e pro-infiammatorio degli estrogeni che sembrerebbero contrastare l’apoptosi dei cloni linfocitari auto-reattivi) e numerosi agenti virali scialotropi come il virus di Epstein-Barr (EBV), il virus dell’epatite C (HCV) ed il retrovirus-I della leucemia umana a cellule T (HTLV-I) (10). Negli ultimi anni, il gruppo di Moutsopoulos ha identificato la presenza di RNA virale di Coxsackie virus nelle biopsie delle ghiandole salivari minori di pazienti con SjS e un’omologia di sequenza dell’87% tra un peptide derivato dalla proteina 2B dei Coxsackievirus e la regione 222-229 dell’epitopo lineare maggiore dell’auto-antigene Ro60KD, che è considerato uno degli auto-antigeni più specifici della SjS (11).

Alla luce delle più recenti acquisizioni, anche se l’eziologia della SjS rimane ancora in larga parte sconosciuta, sono stati elaborati diversi modelli patogenetici in grado di spiegare il ruolo dei diversi elementi cellulari nel danno ghiandolare che si verifica in corso di malattia. Il modello patogenetico più largamente condiviso è quello dell’“epitelite autoimmune” secondo il quale le cellule epiteliali rivestirebbero un ruolo cruciale nella formazione degli aggregati linfocitari periduttali (12). La SjS presenta, infatti, un quadro istopatologico caratterizzato da infiltrati linfocitari focali che interessano generalmente la

regione periduttale delle ghiandole esocrine ma che potenzialmente possono colpire qualunque organo e apparato (es. epitelio tubulare renale, epitelio bronchiale, epitelio dei colangioli epatici etc). Tali aggregati originano essenzialmente dalle interazioni tra le cellule epiteliali e le cellule immuni T e B. Gli aggregati linfocitari sono costituiti essenzialmente da linfociti CD4⁺ positivi che presentano essenzialmente un fenotipo memoria (CD45 RO⁺), esprimono il recettore TCR α/β e sono in grado di secernere INF- γ e IL-10. In percentuale minore sono stati evidenziati anche linfociti T CD8⁺ positivi che esprimono l'integrina (CD 103) e che si localizzano in prossimità di cellule epiteliali acinari E-caderina positive. Il rapporto CD4/CD8 a livello degli infiltrati è di 3:1-5:1. I linfociti B costituiscono solo il 20% degli infiltrati, e ancora più rari sono le cellule natural killer ed i macrofagi (complessivamente < 5%). Accanto agli infiltrati T linfocitari è possibile osservare frequentemente anche delle strutture ectopiche che sono analoghe ai centri germinativi e sono costituite essenzialmente da linfociti B, con una piccola percentuale di linfociti T e di cellule follicolari dendritiche. I linfociti B sono organizzati in una 'dark zone' centrale in attiva proliferazione (centroblasti) e in una zona più periferica 'light zone' di centrociti che vanno incontro a processi di selezione per l'espressione in superficie di anticorpi ad alta affinità. La presenza di questi centri germinativi ectopici è stata associata ad una più elevata positività di autoanticorpi anti Ro/SSA ed anti La/SSB, nonché ad un più alto rischio di trasformazione in senso linfoproliferativo (10). Secondo il "modello epitelitico" le cellule epiteliali, una volta attaccate da un ipotetico agente esogeno, si attiverebbero e inizierebbero a secernere elevate quantità di citochine pro-infiammatorie ed ad esprimere alti livelli di HLA DR richiamando in situ le cellule linfocitarie. Le cellule dell'epitelio ghiandolare fungerebbero da cellule presentanti l'antigene (APC) attivando i linfociti che potrebbero, a loro volta, interagire con i linfociti B innescando la risposta autoimmune (12). Un secondo modello proposto per la formazione degli aggregati è quello di una *disregolazione sistemica dei linfociti T circolanti*, ed in particolare dei linfociti Th1 positivi, che migrerebbero attivamente nelle ghiandole esocrine con un processo di homing mediato dall'adesione alle venule ad endotelio alto (HEV) fin dalle prime fasi di malattia. I linfociti Th1, attraverso la liberazione di citochine proinfiammatorie, ed in particolare di INF- γ , attiverebbero essi stessi le cellule epiteliali e le indurrebbero ad esprimere potenti chemoattrattanti in grado di richiamare altri linfociti e di amplificare il processo infiltrativo (13). I chemoattrattanti implicati sarebbero le chemochine, proteine a basso peso molecolare in grado di reclutare e attivare specifiche sottopopolazioni leucocitarie, modificando l'espressione e lo stato di

affinità delle molecole di adesione sulla superficie leucocitaria. Sulla scia di questa ipotesi, studi recenti hanno focalizzato l'attenzione, in particolare, su alcune chemochine INF- γ -indotte come la CXCL10 e la CXCL9, il cui mRNA è risultato up-regolato a livello delle cellule epiteliali dei dotti salivari dei pazienti con SjS rispetto ai controlli. Tali chemochine sarebbero in grado, a loro volta, di amplificare il processo richiamando ulteriori linfociti T CD3+ (14). Chemochine diverse come la CXCL13, chemoattrattanti verso i linfociti B, e il BAFF, citochina della superfamiglia del TNF, sarebbero, invece, coinvolte nella formazione delle strutture ectopiche simil germinative il cui ruolo nella successiva potenziale trasformazione linfomatosa rimane da chiarire (15). Recentemente, è stato ipotizzato, inoltre, che il ruolo dei linfociti B possa essere ancora più complesso dal momento che essi stessi sarebbero in grado di polarizzarsi, fungere da APC e produrre INF- γ , influenzando la differenziazione dei T-helper in senso T-helper 1. Questi dati porterebbero l'attenzione sui linfociti B come primi orchestratori del processo infiammatorio a carico delle ghiandole salivari (16). Comunque abbiano origine gli infiltrati linfocitari, una volta formati, essi comportano una progressiva distruzione dell'epitelio ghiandolare. Il principale meccanismo di distruzione dell'epitelio ghiandolare è rappresentato dalla morte cellulare programmata o apoptosi mediata dal sistema Fas/FasL e dal rilascio di perforina e granzima A (17). Anche se è ancora da chiarire se lo stimolo iniziale per il processo apoptotico sia intrinseco alle cellule epiteliali o sia mediato dai linfociti T, la formazione di blebs di membrana durante l'apoptosi porterebbe alla traslocazione a livello di membrana di componenti auto-antigeniche intracellulari che in questo modo guadagnerebbero l'ambiente extracellulare e potrebbero evocare la risposta auto-anticorpale. Un altro ulteriore meccanismo di esposizione di auto-antigeni endocitari sarebbe la liberazione di esosomi da parte delle cellule epiteliali ovvero di vescicole di membrana risultanti dalla fusione di endosomi e lisosomi. Tale meccanismo è stato osservato in vitro ma non ancora in vivo (2). I meccanismi patogenetici descritti giustificano, in realtà, una distruzione del 50-60% delle strutture acinari con una riserva funzionale residua del 40% (18). L'entità della compromissione della funzione secretoria è molto superiore nella SS rispetto al danno organico, e ciò ha portato ad ipotizzare che altri meccanismi siano coinvolti nella patogenesi della malattia (18). A livello del tessuto ghiandolare residuo, in particolare, alcuni autori hanno ipotizzato una disregolazione del trasporto dei fluidi, sottolineando in particolare una anomala distribuzione dei canali numero 5 dell'acquaporina nelle ghiandole salivari. Nel tessuto ghiandolare dei soggetti con SjS i canali dell'acquaporina, che regolano i movimenti dell'acqua attraverso le

membrane biologiche, sarebbero espressi non solo a livello apicale luminale ma anche a livello basolaterale determinando un ristagno interstiziale dei fluidi e contribuendo al deficit secretivo. Tale anomala distribuzione sarebbe mediata dal TNF- α e da altre citochine pro-infiammatorie prodotte localmente (19). In letteratura sono presenti dati contrastanti in questo senso; secondo altri autori, infatti, la distribuzione e la densità dell'acquaporina 5 nelle ghiandole salivari non differirebbe nei pazienti con SS rispetto ai controlli sani (20). Altri autori, negli ultimi anni, hanno indagato possibili alterazioni del circuito neurosecretorio che regola il funzionamento delle ghiandole esocrine (21). Sul parenchima ghiandolare sono presenti recettori transmembrana di tipo muscarinico, in particolare gli M3, che legano l'acetilcolina e che regolano il trasporto di ioni e di acqua attraverso le membrane cellulari nei dotti ghiandolari. Il numero dei recettori M3 eccede quello delle sinapsi neuronali ed in questo modo l'acetilcolina rilasciata da una terminazione nervosa può stimolare più acini adiacenti a quello direttamente innervato. Le alterazioni funzionali a carico del circuito neurosecretivo riguardano essenzialmente il braccio efferente del circuito, mentre quello afferente rimane integro considerando che il paziente avverte i sintomi legati alla secchezza orale e oculare. Uno dei meccanismi potenzialmente responsabili dell'iposecrezione potrebbe essere rappresentato da un ridotto rilascio di neurotrasmettitori (Ach) a livello delle giunzioni sinaptiche e/o da un'alterata risposta ai neurotrasmettitori a livello post-sinaptico. Durante il processo infiammatorio, citochine pro-infiammatorie come l'IL-1, il TNF-alfa o l'IL-6, possono interferire con il rilascio di acetilcolina da parte delle terminazioni colinergiche, inibendolo. Anche la produzione di secondi messaggeri a livello post-sinaptico è, allo stesso modo, fortemente condizionata in senso negativo dalla presenza di tali citochine, e di conseguenza le cellule ghiandolari appaiono meno responsive ai segnali efferenti (18). Infine, studi recenti hanno evidenziato un terzo meccanismo di alterazione del circuito neurosecretivo legato alla presenza di elevati livelli di anticorpi anti-M3R nei pazienti con SjS in grado di fungere da antagonisti muscarinici e di inibire la contrazione della muscolatura liscia (21). Il blocco del M3R potrebbe interferire con la secrezione ghiandolare anche contribuendo alla traslocazione dei canali dell'acquaporina (20). In conclusione la patogenesi della sindrome di Sjogren rimane ancora in larga parte da chiarire potendo essere legata sia ad un danno organico che ad un danno funzionale dei diversi parenchimi ghiandolari.

A fronte di tale complessità patogenetica il quadro clinico della sindrome di Sjogren è relativamente uniforme, essendo dominato dai sintomi legati alla secchezza delle mucose orale e oculare. Il coinvolgimento degli altri organi e apparati, seppure potenziale, si

manifesta in una minoranza dei pazienti, solitamente nelle fasi più tardive di malattia e con un'intensità clinica generalmente di tipo lieve-moderato (22). La sintomatologia oculare è caratterizzata da quadri di cheratocongiuntivite secca con ipolacrimazione, arrossamento della congiuntiva e sensazione persistente di corpo estraneo nell'occhio. Nei casi più gravi possono insorgere infezioni oculari ricorrenti e possono manifestarsi abrasioni della superficie corneale ed ulcere che possono comportare un deficit del visus (23). La sintomatologia orale è, invece, caratterizzata da una persistente xerostomia con difficoltà nella masticazione, nell'eloquio e necessità di assumere liquidi molto frequentemente. I pazienti possono riferire, inoltre, modificazioni del gusto (es. 'sensazione metallica in bocca', 'bocca amara'), tosse secca, disfagia, disagio nel portare protesi dentarie e, infine, nicturia con disturbi del ritmo sonno-veglia secondaria all'eccessiva assunzione di liquidi durante le ore diurne. Inoltre, a seconda delle casistiche, danni a carico dei processi di mineralizzazione dentaria ed alterazioni della flora microbica orale con aumento relativo dei batteri 'cariogeni' e delle diverse specie di *Candida* sono osservati fin nell'80% dei pazienti (24). All'esame obiettivo la mucosa orale appare eritematosa e asciutta e di solito si osserva la mancanza di saliva sul pavimento della bocca e/o la presenza di saliva particolarmente densa e viscosa in corrispondenza dello sbocco dei dotti delle ghiandole salivari maggiori. La superficie dorsale della lingua è spesso anch'essa arrossata e può presentare atrofia delle papille filiformi e fissurazioni laterali. In un terzo circa dei pazienti, infine, le ghiandole salivari maggiori possono presentare tumefazioni ricorrenti e bilaterali; la tumefazione delle parotidi è la più evidente ma spesso è preceduta da quella delle ghiandole sottomandibolari che, tuttavia, può essere misconosciuta (25). Nell'ambito delle manifestazioni sistemiche la malattia può potenzialmente colpire tutti gli organi e gli apparati. La tabella 2 riassume i principali quadri clinici descritti in letteratura e la loro prevalenza. La complicanza più temibile della malattia è tradizionalmente considerata l'insorgenza di una malattia linfoproliferativa e, in particolare, di un linfoma non Hodgkin a cellule B, che generalmente è un linfoma di basso grado della zona marginale. In realtà, ad oggi, studi trasversali hanno evidenziato come solo il 4% dei pazienti con SjS presenti tale complicanza ed il solo studio prospettico longitudinale che ne ha valutato l'incidenza, ha evidenziato come il 7% di pazienti con SjS abbia sviluppato tale affezione in un follow-up di cinque anni (26, 27). Tuttavia, analizzando le possibili cause di morte nei soggetti con SjS, non si evidenziano differenze statisticamente significative rispetto alla popolazione generale, se non per il rischio legato proprio alle complicanze linfoproliferative che sono responsabili di un eccesso di mortalità pari a 2.53 per 1000

persone-anno (8). Uno studio multicentrico europeo, condotto su 33 pazienti seguiti in 9 centri, ha, pertanto, recentemente cercato di mettere in evidenza le caratteristiche del subset di pazienti a rischio per linfoma, identificando nella presenza di linfadenopatia, vasculite cutanea, ipocomplementemia, coinvolgimento del sistema nervoso periferico, febbre, anemia e linfopenia potenziali fattori predittivi per una prognosi negativa (28). Fatta eccezione per le complicanze linfomatose, la SjS si presenta, invece, in conclusione, come una malattia a carattere relativamente favorevole e scarsamente aggressiva, anche se a decorso lentamente progressivo, nella quale la qualità di vita dei pazienti è condizionata essenzialmente dalla sintomatologia ghiandolare (29).

Tabella 2: Manifestazioni extraghiandolari e prevalenza

| Apparato/Organo | Quadri clinici | Prevalenza |
|------------------------|---|-------------------|
| Muscoloscheletrico | Artralgie | 60-70% |
| | Artrite | 10-20% |
| | Mialgie | 30-50% |
| Cardiovascolare | F. di Raynaud | 15%-35% |
| Respiratorio | Xerotrachea | 20%-25% |
| | Afezioni bronchiolari di tipo ostruttivo | 20%-33% |
| | Interstiziopatia polmonare (clinica e subclinica) | 8%-35% |
| Genito-urinario | Nefropatia tubulointerstiziale | 15%-20% |
| | Glomerulonefrite | 2%-5% |
| | Dispareunia | 10%-30% |
| Gastroenterico | Disfagia | 25-30% |
| | Epatopatia autoimmune | 5% |
| Cute | Vasculite cutanea | 10% |
| | Xerosi cutanea | 23%-68% |
| ORL | Ipoacusia | 27% |
| Ematologico | Anemia | 18% |
| | Leucopenia | 18% |
| | Linfopenia | 9% |
| SNP | Multinevrite sensitivo motoria | 2-10% |
| | Neuropatia autonoma | ? |
| Endocrino | Tireopatia | 30% |

Dal punto di vista dei dati di laboratorio, nella SjS, gli esami ematochimici routinari possono documentare un'ipergammaglobulinemia policlonale (80%) ed un rialzo della velocità di eritrosedimentazione in presenza di valori normali o solo modificamente alterati della proteina C reattiva (10). La SjS è caratterizzata anche da un ampio spettro di autoanticorpi non organo specifici che comprendono: anticorpi antinucleari (80%), fattore reumatoide (60-90%), anticorpi anti-Ro/SSA (60-80%) e anti-La/SSB (40-60%). La positività del fattore reumatoide si riscontra in media nel 60% dei soggetti ma una caratteristica peculiare della SjS è che, mentre nel siero è presente il fattore reumatoide di

classe IgM, nella saliva, invece, è evidenziabile un fattore reumatoide di tipo IgA, probabilmente prodotto localmente a livello ghiandolare (10). Gli anticorpi anti-Ro/SSA e anti-La/SSB sono considerati i più specifici per la SjS e fanno parte dei criteri classificativi per la malattia (7). Inoltre, gli anti-Ro/SSA sembrano correlare con l'impegno cutaneo vasculitico mentre gli anti-La/SSB con la tumefazione parotidea ed in genere con l'impegno extraghiandolare sistemico (30, 31). I bersagli antigenici degli anticorpi anti-Ro/SSA e anti-La/SSB sono costituiti da complessi ribonucleoproteici, fisiologicamente localizzati a livello citoplasmatico (70%) o intranucleare (30%). Sono descritte due proteine diverse di tipo Ro: una di 52 kDa e una di 60 kDa, mentre è nota una sola proteina di tipo La di 48 kDa. Il complesso ribonucleoproteico è costituito da RNA a basso peso molecolare (28 - 38 kDa) cui si possono fissare direttamente la proteina Ro 60 kDa (all'estremità 5') o la proteina La 48kDa (all'estremità 3'). La proteina Ro 52 kDa si fissa indirettamente all'RNA utilizzando come intermediario la Ro 60 kDa. La funzione delle molecole Ro e La rimane ancora in larga parte sconosciuta. La proteina La/SSB parteciperebbe ai fenomeni di trascrizione del DNA e nella fattispecie al complesso dell'elicasi ATP dipendente per la formazione dell'ibrido RNA/DNA; inoltre essa interverrebbe nella maturazione e nell'esportazione nel citoplasma dei trascritti dell'RNA polimerasi III. La Ro/SSA favorirebbe invece il trasporto dell'RNA dal nucleo al citoplasma. Nel nucleo la Ro 52 è fissata ad alcuni motivi del DNA e fungerebbe da regolatrice dell'espressione genica; la Ro 60, invece, inibirebbe la trascrizione operata dall'RNA polimerasi III (32). Nell'ambito dell'ampio spettro di autoanticorpi descritti un ruolo ancora controverso sembra essere svolto dagli anticorpi anti- α -fodrina. L' α -fodrina è una proteina di 240kDa che appartiene al citoscheletro cellulare e che è stata identificata in tutte le cellule, incluse quelle dei tessuti ghiandolari. Anticorpi anti- α -fodrina di classe IgG o IgA sono stati evidenziati sia nei modelli murini di SjS che nei pazienti con SjS in percentuali variabili tra il 52% e il 93%. Ad oggi, il significato clinico di questi autoanticorpi rimane ancora da chiarire anche se, poichè l' α -fodrina è associata con pompe e canali ionici di membrana, è stato ipotizzato che gli autoanticorpi anti- α -fodrina possano interferire con il funzionamento delle suddette pompe e quindi con la funzione secretoria delle ghiandole (33).

La diagnosi di SjS si basa sulla combinazione di elementi clinici, sierologici, strumentali e istologici. L'iter diagnostico prevede che la sintomatologia soggettiva del paziente relativa alla secchezza degli occhi e della bocca venga registrata mediante questionario validato

(34). Per l'obiettivazione di tale sintomatologia sono utilizzati test oculari per lo studio del film lacrimale (Test di Schirmer e Rosa Bengala) e test di valutazione morfologica e funzionale delle ghiandole salivari maggiori, quali la scialometria, la scialografia e la scintigrafia salivare. In particolare, il test di Schirmer consente di misurare la secrezione lacrimale utilizzando strisce di carta bibula poste nel fornice congiuntivale inferiore per 5 minuti. Il test è positivo se dopo 5' sono bagnati < di 5 mm della striscia di carta bibula. Il Rosa Bengala, oggi sostituito dal verde di lissamina, è, invece, un colorante specifico per cellule devitalizzate e mucina che, in presenza di un danno dell'epitelio congiuntivale o corneale, si fissa sulle cellule rendendo visibili le lesioni epiteliali (23). Dei test di valutazione delle ghiandole salivari maggiori, la scialometria consente di misurare il flusso salivare (patologico se < a 1,5 min /15 minuti), la scialografia di osservare l'architettura e la configurazione del sistema duttale e, infine, la scintigrafia permette una valutazione funzionale delle ghiandole salivari attraverso la velocità di captazione del pertecnato di sodio marcato con Tc 99m (25). Un ausilio per la diagnosi può essere fornito anche dagli esami di laboratorio ed in particolare dalla ricerca degli autoanticorpi anti-Ro/SSA e anti-La/SSB che sono gli unici inclusi nei criteri classificativi internazionali (7). Nell'algoritmo diagnostico, però, la biopsia delle ghiandole salivari minori rappresenta l'indagine "gold standard" ed è universalmente considerata come il criterio più specifico per la diagnosi di SjS (82-95%) (35). La sensibilità dell'esame è più bassa (75-83%) e la percentuale dei falsi negativi è intorno al 20% (36). L'esame viene effettuato praticando una incisione di 1,5-2 cm tra la linea mediana e la commissura della mucosa buccale del labbro inferiore. L'incisione viene effettuata su mucosa integra e le ghiandole prelevate, una volta incluse in formalina, vengono sottoposte all'attenzione del patologo (25). Allo studio istopatologico la ghiandola può mostrare un diverso grado scialoadenite (37, 38). Una scialoadenite aspecifica di grado lieve o moderato non è considerata sufficiente per la diagnosi di SjS, mentre un quadro di scialoadenite focale con almeno un cluster di 50 linfociti per 4 mm² di tessuto (focus) è compatibile con la diagnosi di malattia, anche in accordo con i criteri internazionali (7). Una distribuzione linfocitaria periduttale è inoltre considerata tipica delle forme di SjS primitivo, mentre la distribuzione perivascolare caratterizza prevalentemente le forme di SjS secondaria (38). L'esame istologico delle ghiandole salivari minori non è esente da limiti. Essi sono legati alla sua invasività, all'andamento fluttuante del grado di infiltrazione nelle ghiandole nonché alla necessità di prelevare un campione di tessuto sufficientemente grande considerando la variabilità inter-ghiandolare dell'infiltrato. Un altro limite dell'esame è la riproducibilità del risultato che è in parte

condizionata dall'area ghiandolare esaminata e dalla qualità tecnica del materiale (36). In conclusione, ad oggi non sono stati identificati biomarkers specifici per la diagnosi di SjS, in grado di permettere di formulare ipotesi prognostiche in merito al suo decorso. Anche se la malattia ha un carattere generalmente benigno, tuttavia, considerando il potenziale rischio linfoproliferativo, è auspicabile che possano essere disponibili mezzi diagnostici sempre meno invasivi e più specifici per la SjS.

Ib. SjS: Modificazioni qualitative e quantitative nella composizione della saliva

La SjS, attraverso il sovvertimento strutturale progressivo delle ghiandole salivari e le alterazioni dei processi riassorbitivi e secretivi, determina una riduzione del flusso salivare e può indurre svariate modificazioni della composizione della saliva stessa.

La valutazione quantitativa del flusso salivare viene effettuata, in accordo con i criteri classificativi internazionali, mediante scialometria basale considerando suggestivi di malattia valori uguali o inferiori a 1.5 ml/15 min (7). In realtà, un recente studio olandese ha evidenziato come la riduzione del flusso salivare sia legata, inizialmente, solo ad una riduzione del flusso delle ghiandole sottomandibolari e sottolinguali e come, solo in una fase più avanzata di malattia, si verifichi anche il coinvolgimento delle parotidi (39). In pratica vi sarebbe una progressione temporale nel coinvolgimento delle ghiandole salivari maggiori con l'interessamento, prima, delle sottomandibolari e delle sottolinguali e, dopo, delle parotidi. Lo stesso studio ha confermato come, nella storia naturale della malattia, la composizione della saliva subisca dei cambiamenti con un aumento della concentrazione assoluta del cloro e del sodio e una riduzione dei fosfati. Questi dati confermano studi biochimici precedenti che, fin da metà degli anni '80, hanno iniziato a descrivere come nella saliva dei pazienti con SjS vi fosse un aumento della concentrazione del sodio e del cloro e anche delle proteine totali, dell'albumina, delle IgG e delle IgA (40, 41). Parallelamente, però, è emerso che, anche se la concentrazione assoluta di tali soluti è aumentata, il loro output/minuto è in realtà ridotto e questo dato sarebbe quello in maggior misura responsabile delle alterazioni del cavo orale descritte in corso di malattia (42). Progressivamente, nel tempo, sono state descritte anche ulteriori modifiche a carico della lattoferrina e della beta-2-microglobulina, del lisozima, delle metalloproteinasi MMP-2 e MMP-9 e della callicreina che risulterebbero aumentate, nonché sono state osservate una riduzione nell'attività dell'amilasi e una riduzione del pH salivare (43-47). Gli studi biochimici finora condotti sulla saliva dei pazienti con SjS non sono completamente confrontabili e omogenei. Il principale limite è legato alla difficoltà nel reperire da tutti i pazienti un quantitativo di saliva sufficiente per poter studiare i diversi analiti. Per ovviare ai problemi della raccolta salivare molti studi sono stati condotti su flusso salivare stimolato o selettivamente prelevato da alcune ghiandole, generalmente le parotidi. La stimolazione consente di ovviare al limite del reperimento del campione, tuttavia, l'aumento del flusso può influenzare la concentrazione di alcune proteine che possono risultare ridotte e modificare il pH salivare, aumentandolo. La valutazione del solo flusso

parotideo, inoltre, può fornire risultati parziali in considerazione dell'apparente impegno più tardivo, da parte della malattia, delle parotidi rispetto alle sottomandibolari e alle sottolinguali (39). I parametri oggi ritenuti più sensibili (0.85) e specifici (0.96) sono la combinazione del flusso sottomandibolare e sottolinguale stimolato e la valutazione della concentrazione salivare parotidea del sodio e del cloro (48). Complessivamente, ad oggi, la scialometria e gli studi biochimici condotti sulla saliva risultano in larga parte poco confrontabili, scarsamente riproducibili e di dubbia utilità diagnostica. E' verosimile che la possibilità identificare specifici biomarkers a livello salivare, espressi in maniera diversa nei pazienti rispetto ai controlli, e negli stessi pazienti a seconda dell'attività di malattia, possa consentire di ottenere uno strumento diagnostico non invasivo di indubbia utilità nella cura della SjS; da qui il crescente interesse verso studi di proteomica volti a caratterizzare il profilo proteico della saliva dei pazienti con SjS, valutando simultaneamente un ampio numero di proteine e a partire da minime quantità di fluido salivare dell'ordine di microlitri.

Ic. La proteomica

Il termine “proteomica”, coniato in analogia con il vocabolo genomica nel 1995, indica lo studio di tutte le proteine espresse da un organismo, tessuto o cellula in un preciso istante. (49). Il proteoma è un’entità dinamica perché non solo cellule di uno stesso organismo esprimono proteine differenti, ma anche lo stesso tipo di cellula, in condizioni diverse (età, malattia, ambiente), è caratterizzato da proteine diverse (49). L’analisi diretta delle proteine, rispetto ad un approccio genomico, consente, quindi, di ottenere informazioni precise sui livelli delle proteine presenti, in quel momento, in una cellula o in un fluido biologico rilevandone, inoltre, le possibili modificazioni post-traduzionali (come ad esempio la fosforilazione), che determinano la funzione delle proteine e che risultano particolarmente importanti nella trasduzione del segnale (50, 51).

Negli ultimi anni la proteomica è progredita con crescente interesse nel mondo scientifico e, al momento, è usata come un moderno strumento nella scoperta di farmaci, per la determinazione di processi biochimici implicati nelle malattie, per monitorare processi cellulari, per caratterizzare sia i livelli di espressione che le modifiche post-traduzionali delle proteine, per ricercare differenze tra fluidi biologici o cellule di soggetti sani e malati e per identificare markers di una malattia e possibili candidati per l’intervento terapeutico (52).

Gli studi di proteomica vengono tradizionalmente distinti in tre aree: la *proteomica funzionale* che permette la caratterizzazione dell’attività, delle interazioni e della presenza di modificazioni post-traduzionali delle proteine, per la descrizione a livello molecolare dei meccanismi cellulari; la *proteomica d’espressione* che fornisce la descrizione dell’intero proteoma di una cellula, organismo o tessuto; la *proteomica strutturale* che ha l’obiettivo di identificare e mappare le proteine presenti a livello degli organuli cellulari chiarendone le interazioni reciproche (52).

Le tecnologie proteomiche, a causa della diversità delle proteine, sono le più varie e integrano metodi biologici, chimici ed analitici; la principale tecnologia utilizzata è, però, la spettrometria di massa (MS) che viene associata a metodi differenti di separazione delle proteine (53, 54). La MS è una tecnica altamente sensibile e versatile per lo studio delle proteine e la combinazione della MS, per l’identificazione proteica, con l’elettroforesi bidimensionale (2-DE), come tecnica separativa ad alto potere risolutivo, è il metodo classico e più utilizzato (52).

L'elettroforesi bidimensionale (2-DE) consente di separare, visualizzare, quantificare ed identificare centinaia di proteine a seconda del loro punto isoelettrico e peso molecolare, in un singolo gel, partendo da campioni di complesse miscele proteiche estratte da cellule, tessuti o altri campioni biologici.

La tecnica, introdotta nel 1975, separa le proteine in due step distinti (Fig.1):

1) la 1° dimensione, *Iso-Elettro Focusing (IEF)*, separa le proteine secondo il loro punto isoelettrico (pI).

2) la 2° dimensione, l'*elettroforesi su gel di poliacrilammide (SDS-PAGE)*, separa le proteine secondo il peso molecolare (PM).

Con la 2-DE si possono separare migliaia di proteine, anche quelle che differiscono per un solo amminoacido o per piccole differenze di pI e/o PM, ed ogni spot ottenuto corrisponde ad una singola specie proteica. Per una buona elettroforesi bidimensionale è essenziale un'adeguata preparazione dei campioni: il processo dovrà risultare in una completa solubilizzazione, disaggregazione, denaturazione e riduzione delle proteine del campione. Per la strategia di preparazione dei campioni è importante considerare lo scopo dello studio, infatti step addizionali possono aumentare la qualità del risultato finale, ma portano anche alla perdita di proteine (55).

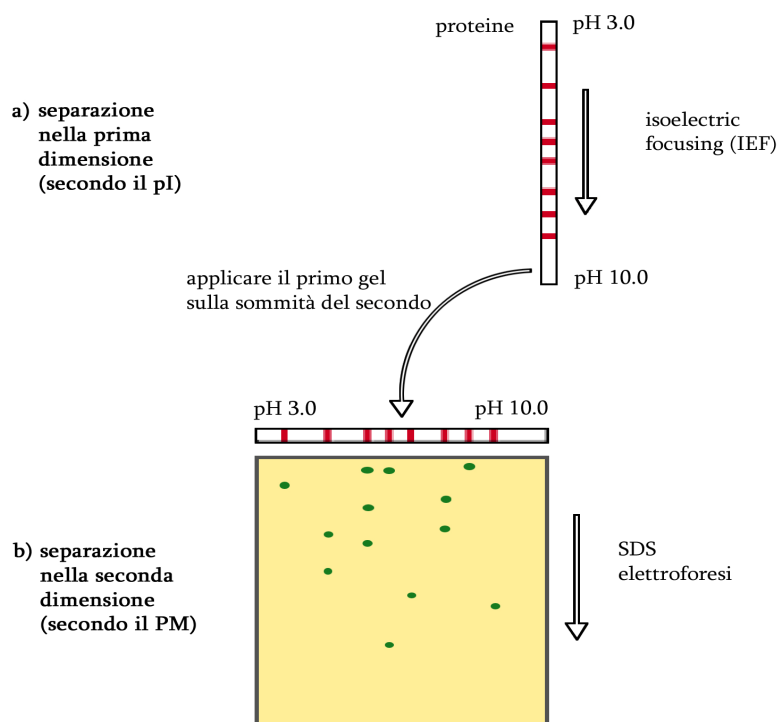


Fig. 1: Elettroforesi bidimensionale.

Prima dimensione

L'IEF è un metodo elettroforetico che separa le proteine secondo il loro punto isoelettrico (pI) utilizzando come supporti delle strip di gel di poliacrilammide. Le proteine sono molecole anfotere: presentano carica netta positiva, negativa o nulla a seconda del pH dell'ambiente in cui si trovano: sono cariche positivamente a pH minori del loro pI e negativamente a pH maggiori. Il punto isoelettrico è il valore di pH al quale la carica netta della proteina è zero. In un gradiente di pH, sotto l'influenza di un campo elettrico, le proteine si muovono fino alla posizione nel gradiente alla quale la loro carica netta è nulla; ad esempio una proteina con carica positiva migrerà verso il catodo, riducendo progressivamente la sua carica positiva, mentre si muove attraverso il gradiente, finché non raggiunge il suo pI. Questo è l'effetto focusing dell'IEF, che concentra le proteine ai loro pI e permette di separarle sulla base di piccole differenze di carica.

La risoluzione del campione è determinata dall'ampiezza del gradiente di pH e dalla forza del campo elettrico. Si utilizzano comunemente voltaggi alti (oltre 1000 V): quando le proteine hanno raggiunto la posizione finale nel gradiente di pH, nel sistema c'è un piccolo movimento ionico che risulta in una corrente finale molto bassa (sotto 1 mA).

L'IEF effettuato in condizioni denaturanti dà la più alta risoluzione ed i risultati migliori.

Originariamente il metodo prevedeva l'utilizzo di tubi di gel di poliacrilammide con gradienti generati da miscele di anfoliti, piccoli polimeri anfoteri che, sotto l'influenza di un campo elettrico, migrano e si allineano secondo i pI, dando un gradiente continuo (Klose J. 1975). A causa delle limitazioni e dei problemi di questi supporti, sono stati sviluppati dei gel a gradiente di pH immobilizzato (IPG), creati incorporando covalentemente un gradiente di gruppi acidi e basici nel gel di poliacrilammide (57). Per le strip sono utilizzate molecole ben caratterizzate, monomeri di acrilammide legati ognuno ad un singolo gruppo basico o acido. Le strip IPG sono prodotte su supporti in plastica usando due soluzioni: una miscela acida ed una basica di monomeri di acrilammide (entrambe contenenti inoltre bisacrilammide e catalizzatori). Le concentrazioni dei gruppi nelle due soluzioni determinano il range di pH del gradiente prodotto (Fig. 2). I gel sono poi lavati, disidratati e tagliati a strisce. In commercio si trovano strip (Amersham Biosciences, Sigma, etc.) di varie lunghezze (7-11-13-18-24 cm) e con vari intervalli di pH (3-10; 4-7; 6-11; 6-9; 3,5-4,5; etc), lineari (L) e non lineari (NL). L'uso delle strip IPG aumenta la riproducibilità e la qualità dei risultati (58).

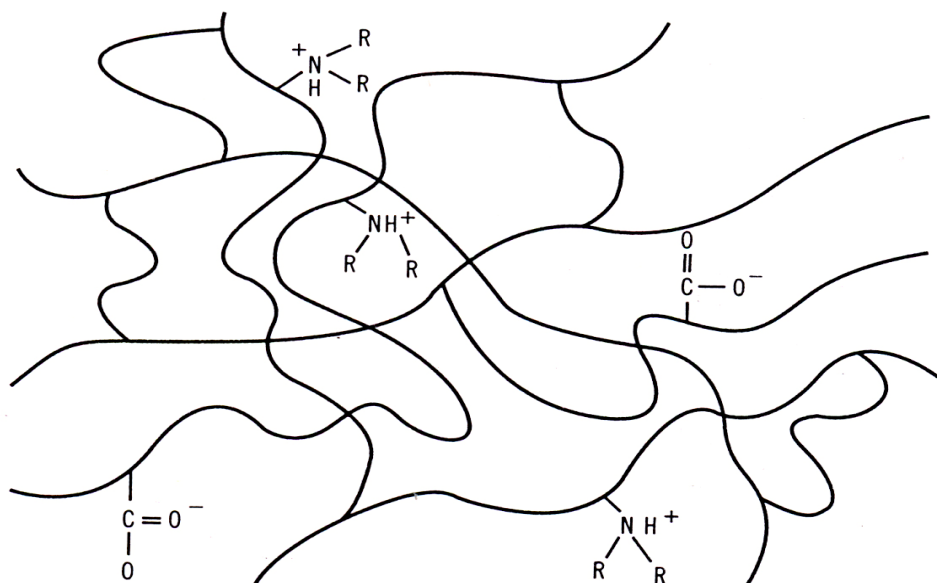


Fig. 2: Rappresentazione grafica della matrice del gel di poliacrilammide con legati i gruppi acidi e basici.

Seconda dimensione

All'IEF segue l'SDS-PAGE, una tecnica elettroforetica che separa i polipeptidi secondo la massa molecolare, utilizzando gel di poliacrilammide. Il sodio dodecil solfato (SDS) è un detergente anionico che in soluzione acquosa stabilizza le molecole proteiche denaturate formando attorno ad esse un guscio di solvatazione (1,4 g SDS/g proteine) che genera micelle dotate della stessa carica elettrica. In questo modo la specifica carica elettrica di una catena polipeptidica viene mascherata dalle cariche negative presenti sulle micelle formate dalle molecole di SDS ed ogni aggregato solubilizzato, proteina-SDS, viene a presentare identica carica negativa per unità di massa. Le particelle anioniche si spostano nel gel di acrilammide, che agisce da setaccio molecolare, separandosi in base al loro peso molecolare mentre migrano in direzione dell'anodo (55).

Per la *visualizzazione dei risultati* possono essere utilizzati molti metodi e le caratteristiche richieste sono: alta sensibilità, ampio range di quantificazione, compatibilità con la spettrometria di massa, bassa tossicità. I metodi più comunemente utilizzati sono il SILVER STAINING o colorazione argentea che è un processo multi-step a vari reagenti molto sensibile (1 ng) o il COOMASSIE STAINING (55). Questo ultimo è circa 50-100 volte meno sensibile (30-50 ng) della colorazione all'argento ma è il solo compatibile con la successiva MS (59).

Le immagini dei gel vengono poi acquisite tramite scanner ed analizzate al computer con software appositi per analizzare complessi campioni proteici separati con l'elettroforesi bidimensionale: un esempio è il software Amersham Biosciences ImageMaster TM 2D Platinum Elite. E' così possibile individuare proteine mancanti o modificate, quantificare gli spot proteici e valutare i cambiamenti nell'espressione proteica in diversi campioni (come controlli vs patologici) (60).

Gli spots proteici di interesse possono essere ulteriormente caratterizzati mediante **spettrometria di massa (MS)**. Uno spettrometro di massa è uno strumento analitico in grado di misurare la massa molecolare di una molecola dopo che essa sia stata ionizzata, ossia dopo che gli sia stata impartita una carica elettrica. Esso è infatti in grado di separare gli ioni molecolari in base al loro rapporto massa/carica. La formazione di ioni di campione in fase gassosa è un prerequisito essenziale per i processi di separazione e di rivelazione tipici di uno spettrometro di massa (61, 62). Esistono molte sorgenti di ionizzazione, ma le più usate nel campo dei peptidi e delle proteine sono la sorgente **MALDI** (matrix-assisted laser desorption/ionization), **SELDI** (surface enhanced laser desorption/ionization) e la sorgente **ESI** (elettrospray ionization) (63). La sorgente MALDI, la cui messa a punto risale alla fine degli anni '80, rappresenta una tecnica di ionizzazione "soft" e quindi applicabile a molecole grandi, non volatili o termicamente poco stabili. La tecnica di ionizzazione del MALDI è detta per desorbimento ed è un processo in cui una molecola viene sia evaporata da una superficie che ionizzata. Il campione viene miscelato ad una matrice (di solito acidi organici non volatili, in modo da ottenere un rapporto matrice/campione pari a 10.000:1) e posto, quindi, su un supporto di acciaio dove viene lasciato cristallizzare. La superficie del campione viene bombardata con fotoni ad alta energia derivanti da un raggio laser pulsato (λ 337 nm). L'impatto deposita energia sul campione, direttamente o mediante la matrice, e porta al trasferimento delle molecole campione in fase gassosa ed alla loro ionizzazione. Nel MALDI si assiste ad una ionizzazione per protonazione ossia le molecole catturano protoni caricandosi positivamente (fig 3) (63). La tecnica SELDI, utilizzata a partire dagli anni '90, consente di separare gli analiti in base alla carica di superficie ed è particolarmente utile nell'identificare ioni di bassa massa e di carica basica. Nella ionizzazione per elettro-nebulizzazione (ESI), infine, gli ioni si formano da soluzioni che vengono finemente nebulizzate attraverso un capillare tenuto ad alto potenziale elettrico. Gli ioni dell'analita, nelle goccioline cariche, vengono volatilizzati in seguito alla rimozione del solvente per

evaporazione e diretti, attraverso un sistema di trasferimento ionico, all'analizzatore di massa (64).

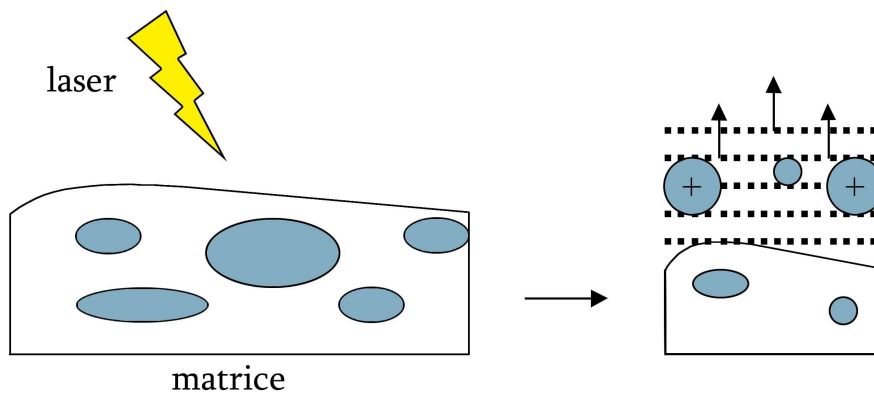


Fig. 3 : MALDI

Una volta ionizzate, le molecole vengono identificate in base al rapporto massa/carica. Il tipo di analizzatore di massa che viene maggiormente usato per l'approccio proteomico classico è il **TOF** (time of flight). Il TOF è essenzialmente costituito da un tubo di lunghezza l nota dove vi è assenza di campo elettrico, ma un'elevata condizione di vuoto. Il vuoto è necessario per permettere agli ioni di raggiungere il detector senza collidere con altre molecole gassose. Queste collisioni potrebbero ridurre la risoluzione e la sensibilità dello strumento e provocare frammentazioni degli stessi ioni. Nel MALDI-TOF un impulso laser desorbe e ionizza le biomolecole. Gli ioni vengono accelerati tramite un voltaggio elevato, acquisendo una velocità che dipende dalla massa: gli ioni leggeri acquisiscono una velocità più elevata rispetto a quelli più pesanti. Entrando in una regione priva di campo elettrico ogni ione mantiene una velocità costante fino a che non raggiunge il rivelatore. Gli ioni di massa differente possono quindi essere separati secondo il tempo: gli ioni più pesanti impiegano più tempo di quelli leggeri. Rilevando il numero degli ioni che arrivano a tempi diversi, è possibile calcolare e visualizzare uno spettro di massa del campione nel quale sono presenti picchi diversi che rappresentano la composizione in ioni con un diverso rapporto massa/carica. Poiché lo stato di carica è solitamente di +1, negli esperimenti di MALDI, è possibile identificare i picchi come rappresentativi delle masse (Fig 4).

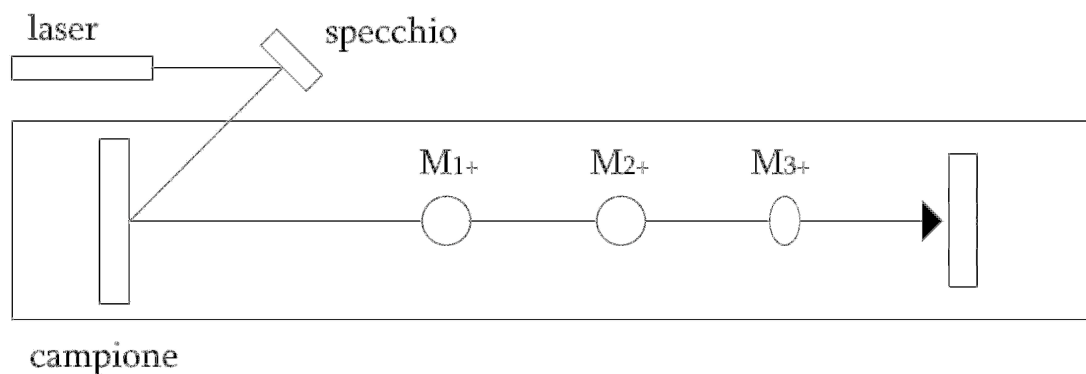


Fig. 4: MALDI-TOF

La MS crea una lista di massa dai peptidi analizzati. Tale lista di massa dei peptidi sconosciuti viene comparata con un database, costituito da proteine note. Comparando la lista di massa dei peptidi della proteina sconosciuta con le liste di massa dei peptidi noti presenti nel database viene effettuata l'identificazione (64) La quantità minima di campione necessaria per l'analisi dipende dalla purezza del campione e di solito è nell'ordine di poche picomoli.

Il vasto range di massa letto, tra 1 e 300 kDa, l'alta accuratezza e la sensibilità rendono il MALDI un metodo d'elezione per l'analisi di tutti i tipi di biomolecole (proteine, acidi nucleici, carboidrati) (65).

In combinazione con l'elettroforesi bidimensionale (e con i database di proteine) il MALDI è particolarmente utilizzato per l'identificazione di spot proteici attraverso 2 approcci principali: la *peptide-mass fingerprinting* (analisi della massa dei digeriti proteolitici) o la *peptide sequencing* (66).

I campioni, di solito, sono separati su un gel e gli spot proteici di interesse sono tagliati e trattati con tripsina, un enzima in grado di rompere i legami peptidici in cui è coinvolto un residuo di arginina o lisina; la miscela di frammenti proteici (peptidi) ottenuta dopo digestione enzimatica è purificata e sottoposta ad analisi di massa. La massa dei peptidi può essere misurata con maggior precisione rispetto a quella delle proteine intatte: i peptidi danno origine ad una library di masse molecolari derivate direttamente dalle proteine, che possono essere identificate con tecniche computazionali e tramite l'utilizzo di database (67). Se la proteina non risulta presente nei database, è possibile ottenere informazioni sulla sequenza dal MALDI con un protocollo di degradazione di Edman modificato: questo è un metodo comune per l'analisi della sequenza delle proteine, che utilizza ripetuti cicli di

rottura dei singoli amminoacidi dal terminale amminico (tramite peptidasi) e successiva identificazione degli amminoacidi staccati con cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC). La miscela di peptidi è analizzata e la sequenza codificata tramite differenze di massa (peptide ladder sequencing) (Fig. 5).

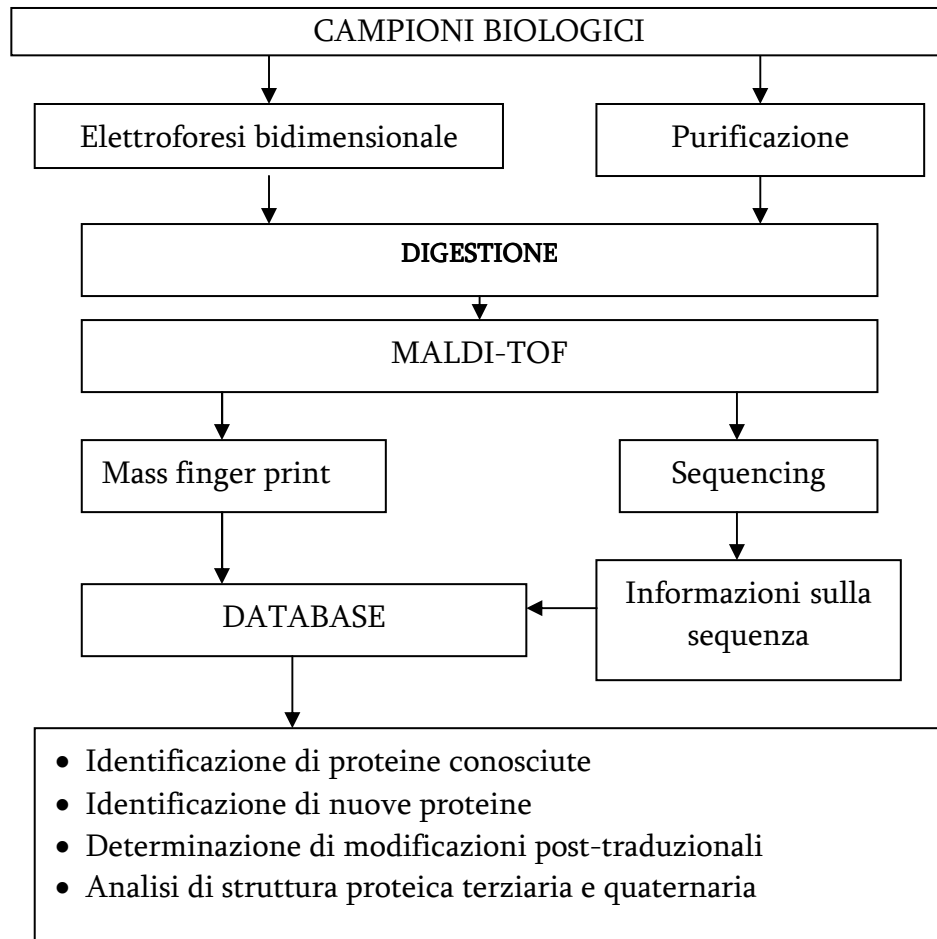


Fig. 5: Schema per l'identificazione di proteine.

Id. Applicazioni cliniche dell'analisi proteomica allo studio della saliva

La saliva in condizioni fisiologiche svolge alcune funzioni fondamentali come: lubrificare e pulire i tessuti orali facilitando il linguaggio, la deglutizione e l'ingestione di cibi; mantenere l'omeostasi nella cavità orale attraverso i tamponi carbonato e fosfato; rimineralizzare i denti con calcio e fosfato; proteggere la superficie dei denti e delle mucose attraverso un'importante azione antimicrobica (lisozima, cistatine, immunoglobuline, lactoferrina, istatine); iniziare la digestione degli amidi grazie all'amilasi salivare (68). La saliva è costituita per il 90% dai fluidi secreti dalle ghiandole salivari maggiori (parotidi, sottomandibolari, sottolinguali) e minori (si trovano nel labbro inferiore, lingua, palato, guance e faringe) e per un 10% è rappresentata dal fluido gengivale crevicolare. La sua composizione è caratterizzata principalmente da acqua (99%), elettroliti ma anche proteine di varia natura (enzimi, mucine, immunoglobuline) (68).

L'analisi della saliva, rispetto ad altri fluidi biologici, offre alcuni vantaggi come il fatto che possa essere raccolta in modo non invasivo da personale con preparazione limitata e senza particolari attrezzature, facilmente anche da pazienti meno collaboranti (bambini, anziani, insufficienti mentali) e che possa fornire un approccio poco costoso per lo screening di grandi popolazioni. I limiti dell'analisi salivare sono, viceversa, rappresentati dall'alta concentrazione di mucine, di residui e di batteri nonché dalla sua alta attività proteolitica (69). La raccolta di saliva direttamente dalle ghiandole che la producono può essere utile per individuare patologie specifiche delle ghiandole, ma oggi, sempre più frequentemente, nella diagnosi delle malattie sistemiche, è la saliva presente nel cavo orale che viene più frequentemente utilizzata; tale utilizzo è in larga parte giustificato dal fatto che la saliva del cavo orale contiene alcuni costituenti del siero che raggiungono le ghiandole salivari per diffusione passiva, per ultrafiltrazione attraverso le giunzioni intracellulari o attraverso il flusso del fluido gengivale (70). Certamente i livelli di certi costituenti serici nella saliva non sono sempre un riflesso dei livelli di questi markers nel siero, ma c'è un crescente interesse nell'uso della saliva e soprattutto nello studio delle proteine salivari per scopi diagnostici, specie nel caso di malattie sistemiche ereditarie, autoimmuni, infettive, nelle neoplasie del cavo orale e per le malattie virali, nonché anche per monitorare i livelli di farmaci, sostanze d'abuso ed ormoni (70, 71). In questo senso, è stato ipotizzato che nella fibrosi cistica, ad esempio, l'antigene carcinoembrionario o la glicosilazione di alcune mucine salivari possano fungere da biomarkers di malattia mentre,

nei pazienti con diabete mellito, la concentrazione salivare di amilasi e IgA salivari risultino aumentate (72).

Negli ultimi cinque anni la ricerca dei biomarkers salivari di malattia è stata potenziata grazie alla tecnologia proteomica che ha permesso di mappare le proteine presenti nella saliva dei soggetti sani analizzando sia il fluido salivare in toto (69, 72-74) che la pellicola salivare adesa ai denti (75), il fluido creviculare (76) e, infine, anche i secreti ghiandolari selettivamente prelevati dalle parotidi, dalle sottomandibolari e dalle sottolinguali (77,78). Il confronto tra il pattern proteico salivare dei soggetti sani e dei malati sta consentendo di rilevare livelli di proteine specifiche che potrebbero essere usati come biomarkers di malattia. E' possibile ipotizzare, con tale approccio, di poter fornire anche informazioni riguardo variazioni semiquantitative sui livelli specifici di ciascuna proteina e rilevare la presenza di isoforme dovute a modificazioni post-traduzionali come fosforilazioni e glicosilazioni. Analisi in questo senso sono già state effettuate per il lichen planus, per alcune neoplasie del cavo orale e della testa e sono in corso per numerose malattie sistemiche (79, 80). Un lavoro preliminare è stato recentemente pubblicato anche per la SjS ma limitatamente all'analisi del secreto parotideo stimolato (81). Questo lavoro, che si colloca nel più ampio panorama delle recenti applicazioni della proteomica allo studio delle malattie reumatiche (Tabella 3), ha messo in luce importanti differenze qualitative e quantitative nei pazienti con SjS evidenziando, in particolare, la riduzione dell'amilasi e della carbonato deidrogenasi e l'aumento dei livelli di alcune proteine come la beta-2-microglobulina, il lisozima C, la cistatina C, la catena immunoglobulinica leggera Igk e il recettore polimerico delle IgG. Alla luce dei risultati incoraggianti finora ottenuti, lo studio delle proteine salivari sembra poter aprire nuovi sbocchi e nuove potenzialità per la ricerca sulle malattie reumatiche, specie nel caso di malattie come la SjS che colpiscono elettivamente le ghiandole salivari.

Tabella 3: *Analisi Proteomica in Reumatologia*

| Malattia | Autore | Materiali |
|---|--------------------------------|---------------------------|
| Osteoartrite | Hermansson M. et al. 2004 (82) | Cartilagine patologica |
| Osteoartrite | De Ceuninck F et al. 2005 (83) | Cartilagine patologica |
| Osteoartrite | Ruiz-Romero C et al. 2005 (84) | Cartilagine patologica |
| Artrite Reumatoide | Sinz A. et al. 2002 (85) | Siero, liquido sinoviale |
| Artrite Reumatoide | Liao H. et al. 2004 (86) | Siero, liquido sinoviale |
| Artrite Reumatoide | Drynda S et al. 2004 (87) | Siero, liquido sinoviale |
| Artrite Reumatoide | de Seny D et al. 2005 (88) | Siero |
| Artrite Reumatoide | An Y et al. 2005 (89) | Siero |
| Artrite Reumatoide, Spondiloartrite, Osteoartrite | Tilleman K et al. 2005 (90) | Sinovia |
| Artrite cronica giovanile | Miyamae T et al. 2005 (91) | Siero |
| Sindrome di Sjogren | Tomosugi N. et al. 2005 (92) | Lacrime |
| Sindrome di Sjogren | Ryu O. et al. 2006 (81) | Saliva (flusso parotideo) |
| Granulomatosi di Wegener | Stone JH. et al. 2005 (93) | Siero |
| Sclerodermia | Fietta A. et al. 2006 (94) | Liquido broncoalveolare |

II. SCOPO DEL LAVORO

Lo scopo di questa tesi è stato quello di caratterizzare il pattern proteico della saliva di pazienti con SjS primitiva utilizzando la tecnologia proteomica. Per lo studio è stato scelto di analizzare il proteoma salivare, inteso come il completo set di proteine presenti nella cavità orale in un dato momento, combinando l'elettroforesi bidimensionale con la spettrometria di massa MALDI-TOF. La scelta della saliva è stata effettuata in relazione al caratteristico impegno clinico delle ghiandole salivari nella SjS, e considerando anche il crescente interesse per la saliva come strumento diagnostico in molte malattie sistemiche; essa, infatti, si configura come un fluido biologico più facilmente reperibile rispetto al siero e con una minore complessità in termini di numero di proteine e variabilità.

I risultati ottenuti sono stati confrontati, in primis, con soggetti sani che presentassero caratteristiche comparabili per sesso e per età.

Successivamente, la popolazione di controllo è stata allargata ad un gruppo di controllo "patologico" eterogeneo con finalità comparative diverse. Sono stati inclusi, allora, nello studio soggetti con xerostomia idiopatica, non affetti da SjS, allo scopo di valutare quali modificazioni del profilo proteico potessero rispecchiare più da vicino le modificazioni del cavo orale imputabili alla secchezza della mucosa orale di per sé. Sono poi stati studiati pazienti con profilo auto-anticorpale analogo ai soggetti con SjS e, nella fattispecie con anticorpi anti-Ro/SSA e anticorpi anti-Ro/SSA + anti-La/SSB, ma non affetti da xerostomia, allo scopo di valutare se esistessero eventuali correlazioni tra il profilo auto-anticorpale e le modificazioni nei livelli di proteine espresse. Infine, sono stati considerati pazienti affetti da un'altra malattia immunomediata capace di coinvolgere, anche se con meccanismi diversi, le ghiandole salivari: la Sclerodermia. La Sclerodermia è una connettivite sistemica, a patogenesi autoimmune, caratterizzata da una progressiva fibrosi che coinvolge la cute e gli organi interni (polmone, tratto gastroenterico, rene, cuore) (95). La malattia è provocata da una incontrollata proliferazione del tessuto connettivo e della matrice extracellulare ad opera dei fibroblasti cui si associano alterazioni vascolari localizzate soprattutto a livello del circolo arterioso più periferico (96, 97). Nella storia naturale della malattia è descritto un potenziale coinvolgimento delle ghiandole salivari di tipo fibrotico direttamente legato alla malattia. L'analisi di tipo istopatologico delle ghiandole salivari di pazienti con Sclerodermia ha, infatti, documentato un aumento del numero delle mast-cellule tissutali nonché un incremento nell'espressione delle isoforme del TGFβ2 e β3 a livello dei fibroblasti ghiandolari; elementi cellulari entrambi coinvolti nei

processi fibrotici (98). Poiché la Sclerodermia può, tuttavia, presentarsi in associazione alla SjS (95) ed è possibile, in questo caso, che i pazienti presentino un coinvolgimento delle ghiandole salivari legato alla sindrome di Sjogren secondaria, nello studio questo ultimo gruppo di pazienti è stato escluso. In conclusione, il gruppo di controllo patologico è risultato costituito da:

- a. soggetti con xerostomia idiopatica
- b. soggetti affetti da Sclerodermia
- c. soggetti asintomatici con anti-Ro/SSA
- d. soggetti asintomatici con anti-Ro/SSA e anti-La/SSB

Il confronto dei patterns proteici tra i diversi subset di soggetti arruolati nello studio ha avuto come obiettivo principale quello di evidenziare le alterazioni qualitative e quantitative peculiari solo dei pazienti con diagnosi di SjS primitiva, nel tentativo di isolare biomarkers specifici di malattia che avessero una potenziale valenza diagnostica per la SjS primitiva. Nell'ambito degli obiettivi secondari si è cercato di giustificare tali alterazioni alla luce delle più recenti acquisizioni eziopatogenetiche e cliniche disponibili per la malattia.

III. MATERIALI E METODI

IIIa. Pazienti

Nello studio sono stati arruolati 15 pazienti di sesso femminile ed età media $49,38 \pm 12,54$ ($M \pm DS$), affette da SjS primitiva e seguite presso l'U.O di Reumatologia dell'Università di Pisa. La diagnosi è stata formulata, nella totalità dei casi, in accordo con i più recenti Criteri Americani ed Europei per la malattia (7). La sintomatologia soggettiva dei pazienti, relativa alla secchezza oculare e all'impegno delle ghiandole salivari, è stata raccolta mediante apposito questionario validato. Per l'obiettivazione della secchezza oculare sono stati eseguiti nella totalità dei casi test di Schirmer e Rosa Bengala (o verde di lissamina) ed in tutti i casi sono stati determinati il profilo bio-umorale (comprensivo dell'elettroforesi proteica) e la ricerca degli autoanticorpi non organo specifici. In particolare, la ricerca degli anticorpi antinucleari, degli anti-Ro/SSA e anti-La/SSB e del fattore reumatoide è stata effettuata, rispettivamente, mediante immunofluorescenza su Hep2, contro-immunoelettroforesi e nefelometria. Infine, i soggetti sono stati sottoposti a biopsia delle ghiandole salivari minori la cui lettura è stata effettuata secondo il grading di Chisolm e Mason (99). Le caratteristiche cliniche e sierologiche delle pazienti sono riassunte nella tabella 4. In tutti i pazienti è stata esclusa un'infezione da virus HBV and HCV, virus scialotropi in grado di determinare una flogosi ghiandolare.

Il gruppo di controllo di soggetti sani è risultato costituito da 15 soggetti sani comparabili per sesso e per età con i pazienti arruolati ($45,83 \pm 17,38$; $M \pm DS$). Lo studio è poi stato allargato a 6 soggetti con sindrome secca idiopatica ($65,16 \pm 6,24$; $M \pm DS$), 6 pazienti con anticorpi anti-Ro/SSA ($38,4 \pm 9,45$; $M \pm DS$), 3 con anti-Ro/SSA ed anti-La SSB positivi senza sindrome secca ($42,33 \pm 7,63$; $M \pm DS$) e 15 pazienti con Sclerodermia diffusa e profilo autoanticorpale omogeneo positivo per anti-Scl 70 (età media $49,5 \pm 10$) ($M \pm DS$). La definizione di sindrome secca idiopatica è stata attribuita a soggetti con xerostomia apparentemente non attribuibile alle più comuni cause virologiche o farmacologiche, con profilo auto-anticorpale negativo e biopsia delle ghiandole salivari con grading di Chisolm Mason ≤ 2 . Nei soggetti asintomatici carrier di autoanticorpi la positività degli autoanticorpi anti Ro/SSA e anti La/SSB è stata confermata in almeno due successive determinazioni. La diagnosi di Sclerodermia, infine, è stata definita in accordo con i criteri classificativi internazionali (100). Sono stati esclusi dallo studio soggetti fumatori. Per l'inclusione nello studio tutti i partecipanti hanno rilasciato un consenso informato.

Tabella 4. *Caratteristiche clinico-sierologiche dei pazienti con SjS in studio*

| Caratteristica | Percentuale |
|---|--------------------|
| Xerostomia | 100% |
| Xeroftalmia | 100% |
| Test oculari (Schirmer o Rosa Bengala) | 100% |
| Uso quotidiano lacrime artificiali | 100% |
| Sensazione di sabbia negli occhi | 75% |
| Necessità di bere frequentemente nella giornata | 50% |
| Tumefazione ghiandole salivari maggiori | 15% |
| Biopsia ghiandole salivari positiva | 80% |
| FAN Hep2>1:160 | 85% |
| Anti-Ro/SSA | 75% |
| Anti-La/SSB | 25% |
| Ra test | 60% |
| Ipergammaglobulinemia | 80% |

IIIb. Materiali e Strumentazione

L'acqua, di grado analitico, è stata filtrata mediante l'apparecchio MilliQ (PS Whatman®, Millipore Corporation, Maid Stone, England).

Tutti i reagenti e i solventi sono stati acquistati dalle più comuni fonti commerciali.

Sono state utilizzate strip Immobiline™ DryStrip pH 3-10 L, di 18 cm, e le Ettan™ IPGphor™ Strip Holder, in ceramica, dell'Amersham Biosciences (Uppsala, Sweden).

L'apparecchio impiegato per l'isoelettrofocalizzazione è stato l'Ettan™ IPGphor™ Isoelectric Focusing System (Amersham Bioscience). Per fare i gel è stato utilizzato il Protean Plus Multicasting Chamber (Biorad).

L'apparecchio per l'elettroforesi usato è il Protean II XL Ready Gel (Biorad) con alimentatore EPS 601 Power Sully (Amersham Bioscience).

IIIc. Raccolta e preparazione del campione

I campioni di saliva dei soggetti sono raccolti tramite sputo, senza stimolazione chimica, al mattino e a digiuno. Per minimizzare la degradazione proteica, i campioni sono stati mantenuti in ghiaccio e trattati immediatamente. Da ogni soggetto sono stati ottenuti 1-2,5 ml di saliva che sono stati centrifugati a 14000 g per 20 minuti a 4°C per rimuovere materiale insolubile e cellule.

Nella preparazione il campione di saliva (già centrifugato per eliminare il materiale insolubile) viene addizionato ad acido tricloroacetico (TCA) al 20% e ditiotreitolo (DTT) allo 0,1% (1 ml di TCA per 1 ml di saliva: concentrazioni finali TCA 10% e DTT 0,05%) e le proteine vengono lasciate precipitare in ghiaccio per 30 minuti. Al termine del periodo di incubazione la sospensione è centrifugata a 14000 g per 10 minuti a 4°C. Il sovrantante viene eliminato, mentre il pellet ottenuto è risospeso con ultraturax in 2 ml di acetone a 4°C, quindi centrifugato a 14000 g per 15 minuti. Questa operazione di lavaggio con acetone freddo viene ripetuta altre due volte al fine di eliminare il TCA. Gli eventuali residui di acetone sono eliminati tramite evaporazione ed il pellet finale, che contiene le proteine presenti nella saliva, viene processato per effettuare la prima dimensione. Il pellet proteico è risospeso nella soluzione di reidratazione. La soluzione di reidratazione utilizzata è composta da:

Urea 7M – Thiourea 2M: servono per solubilizzare e denaturare le proteine così che siano presenti in una sola configurazione;

Chaps 4%: è un detergente non ionico che permette di solubilizzare le proteine idrofobiche e minimizzare l'aggregazione proteica;

Ditiotreitolo (DTT) 60mM: agente riducente, serve per rompere ogni ponte disolfuro e permettere alle proteine di distendersi completamente;

Blu di Bromofenolo 0,002%: per seguire la corsa, se il tracciante non migra all'anodo non c'è flusso di corrente;

Anfoliti (3-10) 0,5%: aumentano la solubilità delle proteine minimizzando la loro aggregazione dovuta ad interazioni carica-carica.

I campioni devono rimanere in tale soluzione 30 minuti, a temperatura ambiente, per ottenere una completa denaturazione e solubilizzazione. Una piccola aliquota del campione viene utilizzata per la determinazione della concentrazione proteica tramite il metodo RC/DC della Biorad (Peterson GL.), il volume restante viene utilizzato per la prima dimensione. Per i gel analitici le aliquote contengono 150 µg di proteine e vengono portate sino ad un volume finale di 350 µl con la soluzione di reidratazione. A questo punto i campioni possono essere utilizzati per la prima dimensione o congelati a -80°C ma in tal caso gli anfoliti sono omessi e vengono addizionati solo al momento della prima dimensione.

Dosaggio proteico RC/DC/BIORAD

Il DC protein assay è un dosaggio colorimetrico con cui viene costruita una curva di riferimento utilizzando una proteina standard che dovrà essere preparata nello stesso tampone del campione proteico di interesse. In questo caso la proteina standard albumina bovina, è risospesa nella soluzione di reidratazione. Vengono preparate quattro concentrazioni (con un volume di 25 µl) di proteina standard (0.2-0.4-0.8-1.5 mg/ml) che abbracciano l'intervallo di sensibilità del metodo (Tab.5).

Tabella 5. *Diluizioni della BSA per la retta di taratura.*

| | Rehydration | BSA | Concentrazione | µg BSA |
|--------|-------------|---------|----------------|--------|
| Bianco | 25µl | - | 0 µg/µl | 0 µg |
| 1 | 21,7µl | 3,3µl | 0,2 µg/µl | 4 µg |
| 2 | 18,3µl | 6,7µl | 0,4 µg/µl | 8 µg |
| 3 | 11,7 µl | 13,3 µl | 0,8 µg/µl | 16 µg |
| 4 | - | 25 µl | 1,5 µg/µl | 30 µg |

Per il dosaggio proteico del campione incognito si procede con una diluizione 1:10 o 1:5 dello stesso (si valuta sulla base del volume di soluzione scelto per la risospensione del campione) con la soluzione di reidratazione per avere un volume finale di 25 µl.

Il dosaggio viene effettuato in eppendorfs, in doppio; come bianco viene dosata la soluzione di reidratazione, a temperatura ambiente.

Agli standars ed ai campioni così preparati sono aggiunti 125 µl di reagente I, agitati su vortex, e incubati 1 minuto. Quindi vengono addizionati 125 µl di reagente II, agitati su vortex e centrifugati a 12000 g per 5 minuti. I sovrantanti sono scartati, e questo primo step è ripetuto variando i volumi di reagente I (125 µl) e II (40µl). Sono quindi addizionati 127 µl di reagente A* per ciascuna eppendorf, agitato e incubato per 5 min o finchè il precipitato non è completamente disciolto. Si addiziona infine 1 ml di reagente B in ciascuna eppendorf agitando immediatamente e si lascia in incubazione per 15 minuti. Al termine del periodo di incubazione si procede alla lettura dei campioni alla lunghezza d'onda di 750 nm.

Si costruisce una retta di taratura nell'intervallo di sensibilità da 5 µg a 37.5 µg: $y=Ax$, e dall'equazione della retta si procede al calcolo della concentrazione proteica per il campione incognito.

$$\frac{(\text{lettura campione} - \text{lettura bianco})}{\text{assorbanza}} \times \text{fattore diluizione} = \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$$

IIIId. Elettroforesi Bidimensionale

Isoelettrofocalizzazione

La prima dimensione è effettuata su strip di 18 cm in cui è presente un gradiente lineare di pH 3-10 (Amersham Biosciences).

-Il volume caricabile su una strip da 18 cm è di 350 µl.

-Il volume del campione deve essere < al 25% del volume totale.

-Al momento vengono aggiunti 0,5% di anfoliti.

Si caricano su strip holder i 350 µl del campione (pari a 150 µg di proteine); si pone sopra l'IPG strip e si copre con l'IPG Cover Fluid (Amersham Biosciences), un olio minerale che minimizza l'evaporazione e la cristallizzazione dell'urea, prima di chiudere con l'apposito coperchietto.

Per la prima dimensione è utilizzato l'Apparecchio IPGphor (Amersham Biosciences) che permette di impostare reidratazione e IEF del campione contemporaneamente (Tabella 6). Il programma utilizzato come tempi e voltaggio applicati è sotto elencato e arriva a permettere di ottenere fino ad ottenere 70000 V totali:

Tabella 6. *Ettan IPGphor Isoelectric Focusing System.*

| | | | |
|---------------|-----|-------|------|
| reidratazione | 1h | 0V | 16°C |
| I step | 10h | 30V | 16°C |
| II step | 1h | 200V | 16°C |
| III step | 30' | 300V | 16°C |
| IV step | 3h | 3500V | 16°C |
| V step | 10' | 5000V | 16°C |
| Vi step | 12h | 8000V | 16°C |

Gli alti voltaggi raggiunti richiedono un controllo della temperatura che infatti è mantenuta a 16°C per tutta la corsa. Inoltre, dopo la reidratazione delle strip, vengono inseriti sugli elettrodi dei quadratini di una apposita carta per isoelettrofocusing (electrode pads). Tali pads vengono inumiditi con acqua MilliQ e posti tra la strip e gli elettrodi per preservare questi ultimi dalla precipitazione degli ioni.

Al termine della IEF la strip viene ripulita dall'eccesso di olio minerale e utilizzata subito per la seconda dimensione o conservata a -20 °C.

Equilibratura

Prima di effettuare la seconda dimensione la strip viene equilibrata incubandola, in successione, con:

- 1) 10 ml di SDS Equilibration Buffer + DTT 1% per 15 minuti in agitazione a temperatura ambiente;
- 2) 10 ml di SDS Equilibration Buffer + IAA 2,5% per 15 minuti in agitazione a temperatura ambiente;

L' SDS equilibration buffer contiene:

Tampone equilibrante (Tris-HCl 50 mM pH 8,8): per mantenere le strip in un range di pH appropriato per l'elettroforesi;

Urea (6 M) *Glicerolo* (30%): per ridurre l'elettroosmosi e migliorare il trasferimento delle proteine alla seconda dimensione. L'elettroosmosi è dovuta alla presenza di cariche fisse sulla strip all'interno di un campo elettrico e può interferire con il trasferimento delle proteine dalla strip al gel della seconda dimensione;

Sodio dodecil solfato (2%): denatura le proteine e forma complessi proteina-SDS carichi negativamente. La quantità di SDS legato ad una proteina, e quindi la carica negativa, è direttamente proporzionale alla massa della proteina, in questo modo l'elettroforesi separerà le proteine in base al loro peso molecolare;

Blu di Bromofenolo (0,002%): usato come agente tracciante per seguire la corsa elettroforetica;

Ditiotreitolo (1%): agente riducente per preservare lo stato ridotto delle proteine;

Iodoacetammide (2,5%; al 2° lavaggio): per alchilare i gruppi tiolici delle proteine e prevenirne la riossidazione durante l'elettroforesi.

Seconda Dimensione

La strip viene posta sopra un gel di poliacrilammide 12% (20cm×20cm×1,5mm), facendo bene attenzione che aderisca in tutta la sua lunghezza al gel, e bloccata con una soluzione di agarosio 0.1% in Running Buffer.

L'elettroforesi è effettuata in due step: per i primi 15 minuti si impostano 15 mA per gel aumentando poi la corrente a 40 mA per gel finché il fronte del campione, visualizzato tramite il Blu di bromofenolo, esce dal fondo di corsa (circa 5:30 ore).

Per la corsa elettroforetica si utilizza il RUNNING BUFFER 10X (Tris-base 25mM, Glicina 192 mM, SDS 0.1%) diluito 1:10; la diluizione viene fatta il giorno precedente per mantenere il tampone a 4°C e poterlo utilizzare freddo.

Preparazione Del Gel 12% Nel Multicasting

Al fine di minimizzare la variabilità sperimentale e quindi aumentare la riproducibilità, i gel di acrilammide (12%) vengono preparati contemporaneamente (fino ad 8 gel-Tabella 7) utilizzando l'apparecchio Multicasting della Biorad e la corsa è condotta su di un apparecchio Protean II XI Multi-cell 2D in grado di ospitare e far correre contemporaneamente fino a 6 gel in condizioni termostate (circa 10°C).

Tabella 7. Volumi per 6 ed 8 gel di acrilammide al 12%.

| | 6 gel | 8 gel |
|---------------------------------|----------|----------|
| H ₂ O milliQ | 142.8 ml | 190.4 ml |
| Tampone Tris 1.5M pH8.8 | 105 ml | 140 ml |
| Acrilammide/bis-acrilammide 30% | 168 ml | 224 ml |
| Ammonio persolfato 10% | 2.1 ml | 2.8 ml |
| Temed | 105 µl | 140 µl |

Colorazione dei gel

I gel bidimensionali così ottenuti sono stati colorati utilizzando una colorazione all'argento/ammoniaca.

Alla fine della seconda dimensione, il gel viene rimosso dai vetri ed è lavato con acqua deionizzata per 5 min, quindi lasciato in etanolo:acido acetico:acqua (40:10:50) per un'ora, e successivamente in etanolo:acido acetico:acqua (5:5:90) per tutta la notte. All'indomani il gel viene sottoposto ad un processo multi-step:

- Viene lavato per 5 min con acqua deionizzata;
- Si lascia per 30 min in una soluzione di 1% glutaraldeide e 0,5M sodio acetato;
- Si lava 3x10 min con acqua deionizzata;
- Viene incubato 2x30 min con una soluzione di acido 2,7-naftalene disulfonico 0,05%;
- Al termine di questo periodo di incubazione il gel è nuovamente lavato 4x15 min con acqua deionizzata;
- Viene quindi colorato in una soluzione fresca di nitrato di argento 2,5% e ammoniaca 30% per 30 min;
- Dopo la colorazione, il gel è lavato con acqua deionizzata 4x4 min e sviluppato in soluzione di acido citrico 0,01% e formaldeide 0,1% per 3:40 min;
- La reazione è stoppata con una soluzione di Tris 5% e acido acetico al 2%.

Tutte gli steps della colorazione sono condotti a temperatura ambiente e sotto agitazione, inoltre i tempi di sviluppo sono mantenuti costanti per tutti i gel per poter fare confronti quantitativi oltre che qualitativi tra gel differenti.

Gel Preparativi

Per l'identificazione delle proteine d'interesse occorre estrarre queste ultime dal gel perché possano poi essere sequenziate tramite spettrometria di massa MALDI-TOF; la colorazione all'argento utilizzata non risulta però compatibile con la spettrometria di massa, pertanto occorre realizzare gel preparativi che saranno colorati con il Coomassie Colloidale; una colorazione meno sensibile di quella all'argento.

Questa procedura richiede quindi di caricare un quantitativo maggiore di proteine, nel nostro caso abbiamo caricato 1500 µg.

Prima dimensione

Per i gel preparativi si carica un volume di campione pari a 1500 µg e si arriva ad un volume finale di 400 µl con la soluzione di reidratazione. Si utilizzano sempre strip da 18 cm con un gradiente lineare di pH 3-10 e si aggiungono al momento 0,5% di anfiliti.

Cambia il programma utilizzato (Tabella 8):

Tabella 8. *Isoelettrofocusing per gel preparativi*

| | | | |
|---------------|------|-------|------|
| reidratazione | 1h | 0V | 16°C |
| I step | 12 h | 30V | 16°C |
| II step | 11h | 200V | 16°C |
| III step | 2 h | 300V | 16°C |
| IV step | 3h | 3500V | 16°C |
| V step | 3h | 3500V | 16°C |
| VI step | 15 h | 5000V | 16°C |

Seconda dimensione e colorazione

La procedura della seconda dimensione è analoga a quella utilizzata per i gel analitici ma per la colorazione si utilizza il Coomassie Brilliant Blue G-Colloidal che, a differenza della colorazione all'argento, è compatibile con la spettrometria di massa. Il *Coomassie Colloidale* contiene:

0,12% Coomassie Brilliant Blue G-250

10% Ammonio solfato

2% Acido fosforico.

Il colorante così preparato deve essere diluito al momento dell'utilizzo con il metanolo (4 parti di colorante per 1 di metanolo) agitando per 30 secondi. La colorazione prevede pochi passaggi:

- Terminata la corsa, il gel viene lasciato per un'ora, in agitazione, nella soluzione di fissaggio contenente il 7% di acido acetico ed il 40% di metanolo;
- Il gel è messo in incubazione nel colorante dalle 2 alle 12 ore;
- Si sostituisce il colorante con una soluzione di acido acetico (10%) e metanolo (25%) mantenendo il gel in agitazione, a temperatura ambiente, per 60 secondi;
- Si cambia la soluzione con un'altra di metanolo (25%), sempre agitando il gel, sostituendola dopo pochi secondi con una nuova di metanolo (25%) che può essere lasciata fino a 24 ore.

Analisi dei Gel Tramite Image Master 2D Platinum

Le immagini dei gel sono state acquisite tramite uno scanner (Epson Expression 1680) e analizzate con il programma Image Master 2D Platinum 5.0 dell'Amersham Bioscience. Tramite software si possono mettere a confronto i gel ottenuti dall'elettroforesi bidimensionale della saliva. Gli spots proteici di ciascun gel sono selezionati, numerati e confrontati (sovrapposti). I gel sono divisi nelle diverse classi in modo che il programma sia poi in grado di effettuare un confronto tra i gel all'interno della stessa classe e tra classi diverse. Il programma permette, infatti, di evidenziare eventuali variazioni nell'entità e/o nella presenza o assenza di determinate proteine. Dopo la messa in evidenza degli spot nei gel, sempre mediante software vengono generati dei gel sintetici uno per ciascuno dei gruppi di soggetti di volta in volta esaminati. Ciascuno dei gel sintetici contiene esclusivamente gli spot comuni a tutti i singoli gel del gruppo in esame ovvero solo gli spot espressi nella totalità dei gel del gruppo di soggetti in esame può entrare a far parte del gel sintetico. La finalità dei gel sintetici è stata quella di isolare un numero definito di proteine di interesse che sono state poi caratterizzate mediante spettrometria di massa. La valutazione quantitativa della densità ottica delle proteine nei diversi gruppi di soggetti in studio è, invece, stata valutata mediante il confronto delle medie dei singoli valori ottenute considerando gli spots proteici dei singoli gel di ciascun gruppo.

IIIe. MALDI-TOF

Preparazione dei campioni per MALDI-TOF

Gli spots proteici di interesse sono tagliati dal gel utilizzando per la digestione la tripsina seguendo la seguente procedura:

- i gel ottenuti mediante 2-DE vengono trattati con bicarbonato di ammonio 50mM e acetone (AcN) 30% per 30' a temperatura ambiente
- i gel vengono disidratati per 30' in una centrifuga Hetovac (HETO, Allerod, Denmark) e quindi reidratati per 45' a 4°C in 5-20 µl di una soluzione 50 mM di bicarbonato di ammonio contenente tripsina a 6.25 ng/ µl
- Dopo il periodo di incubazione di una notte, i gel vengono disidratati in centrifuga, reidratati con 20 µl di H₂O e alla fine disidratati di nuovo
- L'eluizione dei peptidi viene effettuata con 20 µl di acido trifluoroacetico (TFA) all'0.1% per 20' a temperatura ambiente
- La soluzione di TFA contenente le proteine di è trasferita in un tubo di propilene
- Una seconda eluizione dei peptidi viene effettuata con 20 µl di TFA allo 0'1% in 50% AcN per 20' a temperatura ambiente
- Le due eluizioni vengono poste insieme e il volume complessivo viene ridotto di 1-2 µl per evaporazione
- Estrazioni di controllo vengono effettuate utilizzando parti dei gel privi di proteine
- Gli spots sono così inviati al Core Facility Proteomic (Università di Ginevra) per l'analisi spettrometrica che consente di identificare le proteine.

Identificazione proteica mediante finger printing (MALDI-TOF)

Prima del finger printing, le soluzioni contenenti i peptidi vengono addizionate con TFA allo 0.1% in 50% AcN e portate ad un volume di 5 µl. Un microlitro di ciascun campione viene depositato su una piastra 2 x 96 della MALDI e portato a secco sottovuoto. Viene aggiunto un ugual volume di matrice (10 mg/ml α -cyano-4-hydroxycinnamic acid in 50% AcN, 0.1% TFA). I campioni vengono portati a secco sottovuoto nuovamente. La MS è stata condotta mediante lo spettrometro Voyager super STR (Applied Biosystems, Foster City, CA) corredato di un laser nitrogene di 337 nm. L'analisi è stata eseguita in reflectrone con un acceleratore di voltaggio di 20 kV, un parametro di ritardo di estrazione di 350 ns, e un limite basso di massa di 850 Da. Gli spettri sono stati ottenuti dalla somma di 150-300 spari laser consecutivi. I picchi di massa sono stati estratti dagli spettri e l'identificazione proteica è stata effettuata utilizzando il MASCOT 2.1 peptide mass

fingerprint tool e il motore di ricerca ProFound del PROWL (<http://prwl.rockefeller.edu>). Come databases sono stati utilizzati il SWISS_PROT e il TrEMBL utilizzando come limiti per la ricerca i seguenti: specie umana, tolleranza della massa ± 50 ppm, clivaggio perso con la tripsina fino a 1 e modificazioni della cisterna per carbamidometilazione.

III f. Analisi Statistica

I valori di densità ottica delle proteine di interesse sono stati espressi come % di volume. L'analisi statistica di comparazione tra i livelli di espressione delle singole proteine nella saliva dei pazienti arruolati è stata effettuata mediante test ANOVA per il confronto delle medie tra più gruppi analizzati simultaneamente e mediante *t*-test per il confronto delle medie dei gruppi a due a due. Un p-value <0.05 è stato considerato statisticamente significativo.

IV. RISULTATI

IVa. ANALISI DEI GEL SINTETICI

Le figure allegate rappresentano rispettivamente le immagini dei gel sintetici e dei gel rappresentativi ottenuti dalla saliva dei soggetti sani e dei pazienti con SjS, Sclerodermia, sindrome secca, e profilo autoanticorpale patologico: anti-SSA e anti-SSA + anti-SSB positivi. (Fig 6-17 vedi allegati)

Il confronto della percentuale di volume degli spot presenti nei gel sintetici dei gruppi in esame, considerati a due a due, ha evidenziato differenze statisticamente significative nell'espressione qualitativa e quantitativa di numerose proteine salivari.

In particolare, comparando il gel sintetico ottenuto dal gruppo di pazienti affetti da SjS con quello dei controlli, è stato possibile identificare 10 spots presenti solo nel gel sintetico patologico e 4 spots presenti solo in quello dei controlli. Nell'ambito dei 10 spots è stata evidenziata la presenza di diverse proteine con pI tra 5,0 e 6,5 e PM intorno a 30-45 Kda, come il precursore della Zn- α_2 -glicoproteina (spot n° 33)*, anche se l'analisi di massa non è stata in grado di identificare la totalità degli spots (spots n°48, 46, 30, 34). E' inoltre stato possibile documentare la presenza di numerose proteine coinvolte nei processi flogistici come: la calgranulina B, la lipocalina e la fosfatidiletanolamina binding protein, nonché, spots (n°47) relativi all'espressione della catena leggera κ delle immunoglobuline. Nell'ambito degli spots presenti solo nel gel sintetico dei controlli è invece da sottolineare quello (spot n° 29) relativo alla carbonato anidrasi VI e alle cistatine e ai loro precursori (cistatina D, C, S) (spots n° 5,7,12). La tabella 9 riassume le principali differenze qualitative che lo studio ha permesso di evidenziare. La tabella 10 mostra, invece, le differenze quantitative relative alle proteine la cui espressione differisce di almeno due volte nei due gruppi. L'analisi dei gel, infatti, ha mostrato 14 spots caratterizzati da una diversa intensità tra pazienti e controlli: 10 spots mostravano un costante incremento (spots n°10, 35, 36, 32, 17, 2, 4, 18, 19, 21) nei malati rispetto ai controlli mentre 4 risultavano significativamente meno intensi (spots n°40, 9, 23, 16) nei pazienti con SjS (102,103).

**I numeri degli spots si riferiscono ai gel rappresentativi*

Tabella 9. Proteine presenti esclusivamente nel gel sintetico dei pazienti con Sjs o nei soggetti sani

| Spot No | Protein | Swiss-Prot accession no | Mr (x10 ³) | pI | sequence coverage% | Matched peptides |
|-----------------------|--|-------------------------|------------------------|------|--------------------|------------------|
| Controlli sani | | | | | | |
| 5 | Cystatin D | P28325 | 16.1 | 7.63 | 31 | 5 |
| 7 | Cystatin C precursor | P01034 | 16 | 9.00 | 49 | 14 |
| 12 | Cystatin S precursor | P01036 | 16.4 | 4.95 | 68 | 12 |
| 29 | Carbonic anhydrase VI | Q5FC00 | 35.4 | 8.43 | 24 | 9 |
| Sjs | | | | | | |
| 41 | Calgranulin B | P06702 | 13.2 | 5.71 | 76 | 9 |
| 42 | Cyclophilin A | P62937 | 18 | 7.82 | 85 | 17 |
| 43 | Lipocalin-1 precursor | P31025 | 19.4 | 5.39 | 31 | 4 |
| 45 | Phosphatidyl ethanolamine binding protein (PEBP) | P30086 | 21 | 7.42 | 92 | 20 |
| 47 | IGKC protein | Q6GMW1 | 26 | 7.55 | 41 | 8 |
| 33 | Zinc- α_2 -glycoprotein precursor | P25311 | 34 | 5.57 | 23 | 11 |

Tabella 10. *Proteine espresso con diversa concentrazione nei gel sintetici dei SjS e dei controlli sani*

| Spot No | Protein name | Swiss-Prot accession no. | Mr(x10 ³) | | pI | | sequence coverage % | Matched peptides | Score |
|---------|--|--------------------------|-----------------------|--------|-------|--------|---------------------|------------------|-------|
| | | | Theor | Observ | Theor | Observ | | | |
| 10 | fatty acid-binding protein(E-FABP) | Q01469 | 15.3 | 12.0 | 6.84 | 6.48 | 68 | 17 | 108 |
| 35 | ACTB protein (actin) | Q96E67 | 40.5 | 40.1 | 5.55 | 5.24 | 57 | 21 | 114 |
| 36 | β-actin fragment | Q96HG5 | 41.3 | 41.0 | 5.56 | 5.04 | 23 | 8 | 50 |
| 32 | leukocyte elastase inhibitor | P30740 | 42.8 | 40.7 | 5.90 | 6.08 | 23 | 8 | 43 |
| 17 | glutathione-S-transferase | P09211 | 23.4 | 23.4 | 5.44 | 5.56 | 32 | 6 | 48 |
| 40 | α-amylase precursor | P04745 | 58.4 | 54.9 | 6.47 | 6.40 | 62 | 31 | 177 |
| 9 | cystatin SN precursor | P01037 | 16.5 | 12.0 | 6.82 | 7.52 | 69 | 10 | 105 |
| 23 | keratin 6-L | Q5XKE5 | 58 | 33.1 | 6.75 | 4.52 | 14 | 7 | 37 |
| 16 | prolactin-inducible protein precursor(PIP) | P12273 | 16.8 | 14.8 | 8.26 | 4.64 | 69 | 10 | 105 |
| 18 | not identified | -- | nd | 23.4 | nd | 5.20 | -- | -- | -- |
| 19 | not identified | -- | nd | 23.9 | nd | 5.00 | -- | -- | -- |
| 21 | not identified | -- | nd | 24.5 | nd | 7.32 | -- | -- | -- |
| 4 | not identified | -- | nd | 11.8 | nd | 5.60 | -- | -- | -- |
| 2 | not identified | -- | nd | 42.8 | nd | 6.36 | -- | -- | -- |

Il confronto tra il gel sintetico dei pazienti con Sclerodermia e dei controlli sani ha, invece, messo in luce 20 spots che sono risultati presenti solo nelle immagini bidimensionali dei soggetti con Sclerodermia ed assenti nei controlli. Con la spettrometria di massa è stato possibile identificare 13 di tali 20 spots che sono risultati confluire in 9 proteine identificate come: ciclofillina A (spot n°42), calgranulina B (spots n°41, 52, 53, 54), psoriasina (spot n°55), beta-2-microglobulina (spot n°56), calgranulina A (spot n°57, 58), gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (spot n°64), TPI (spot n°65), complesso Arp2/3 (spot n°67) e cistatina B (spot n°59). La tabella 11 riassume questi risultati.

Nel confronto tra gel sintetico dei pazienti con Sclerodermia e SjS gli spots relativi a psoriasina (spot n°55), calgranulina A (spot n°57, 58), gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (spot n°64), TPI (spot n°65), complesso Arp2/3 (spot n°67) e cistatina B (spot n°59) e carbonato anidrasi VI (spot n°26-29) risultavano presenti solo nel gel sintetico dei pazienti con sclerodermia. Non risultavano, invece, identificabili nel gel sintetico dei pazienti con Sclerodermia gli spot relativi alla E-FABP e alla lipocalina . Ulteriori differenze tra gel sintetici dei pazienti con SjS e Sclerodermia emergevano nell'espressione delle cistatine e dei loro precursori, dell' α -amilasi salivare, della cheratina 6L, della PIP, della glutatione-S-transferasi e dell'inibitore dell'elastasi leucocitaria.

Tabella 11. Spot proteici identificati solo nel gel sintetico dei pazienti con Sclerodermia e non nei controlli

| Spot No | Protein | Swiss-Prot accession no | Mr (x10 ³) | pI | sequence coverage% | Matched peptides |
|---------|---|-------------------------|------------------------|------|--------------------|------------------|
| 41 | Calgranulin B | P06702 | 13.2 | 5.71 | 76 | 9 |
| 52 | Calgranulin B | P06702 | 13.2 | 5.71 | 53 | 5 |
| 54 | Calgranulin B | P06702 | 13.2 | 5.71 | 70 | 7 |
| 53 | Calgranulin B** | P06702 | 13.2 | 5.71 | 55 | 7 |
| 55 | Psoriasis | P31151 | 11.4 | 6.26 | 49 | 7 |
| 56 | β2-microglobulin | Q6IAT8 | 13.8 | 6.06 | 37 | 4 |
| 57 | Calgranulin A | P05109 | 10.8 | 6.51 | 62 | 8 |
| 58 | Calgranulin A | P05109 | 10.8 | 6.51 | 63 | 11 |
| 59 | Cystatin B | P04080 | 11.1 | 6.96 | 64 | 6 |
| 42 | Cyclophilin A | P62937 | 18 | 7.82 | 54 | 11 |
| 64 | Glyceraldeyde-3-**-phosphate dehydrogenase | P04406 | 35.9 | 8.58 | 23 | 5 |
| 65 | Triose phosphate isomerase | P60174 | 26.8 | 6.51 | 62 | 15 |
| 67 | Actin-related protein 2/3 complex subunit 2 | O15144 | 34.4 | 6.84 | 43 | 18 |

I risultati del confronto dei rimanenti gel sintetici sono riassunti nella Tabella 12

Tabella 12: Gel sintetici a confronto

| | | | | | | |
|------------|----------------------------------|---------|------|-----------------------|-----|-------------------|
| vs | Sindrome secca idiopatica | | | | | |
| SjS | lipocalina | amilasi | PEPB | Carbonato anidrasi VI | PIP | Cistatina B, D, S |

| | | | | | | |
|------------|--------------------|---------|-----------------------|-----|-------------------|--|
| vs | Anti-Ro/SSA | | | | | |
| SjS | lipocalina | amilasi | Carbonato anidrasi VI | PIP | Cistatina B, D, S | |

| | | | | | | |
|------------|----------------------------------|---------------------------------|--|--|-----|-------------|
| vs | Sindrome secca idiopatica | | | | | |
| SjS | lipocalina | Inibitore elastasi leucocitaria | | | PIP | Cistatina D |

| | | | | | | |
|---------------------|----------------------------------|-------------|----------------|--------------|-----|----------------|
| vs | Sindrome secca idiopatica | | | | | |
| Sclerodermia | Cistatina B | Cistatina S | Calgranulina B | Cistatina SN | PIP | Ciclofillina A |

| | | | | | | |
|---------------------|--------------------|-------------|----------------|--------------|--------|---------------------------|
| vs | Anti-Ro/SSA | | | | | |
| Sclerodermia | Cistatina B | Cistatina D | Calgranulina B | Cistatina SN | actina | β -2 microglobulina |

| | | | | | | |
|---------------------|----------------------------------|--|---------|--------------|--|--|
| vs | Anti-Ro/SSA + Anti-La/SSB | | | | | |
| Sclerodermia | Cistatina B | | amilasi | Cistatina SN | | |

| | | | | | | |
|--------------------|----------------------------------|--|----------------------|--|----------------------|--|
| vs | Anti-Ro/SSA + Anti-La/SSB | | | | | |
| Anti-Ro/SSA | β -2 microglobulina | | Spot n° 68 (non id.) | | Spot n° 80 (non id.) | |

| | | | | | | |
|--------------------|----------------------------------|--|-------------|----------------|-----|--|
| vs | Sindrome secca idiopatica | | | | | |
| Anti-Ro/SSA | Calgranulina B | | Cistatina S | Calgranulina A | PIP | |

| | | | | | | |
|----------------------------------|----------------------------------|----------------------|----------------|---------------------|--|--|
| vs | Sindrome secca idiopatica | | | | | |
| Anti-Ro/SSA + Anti-La/SSB | amilasi | Spot n° 91 (non id.) | Calgranulina B | Spot n° 5 (non id.) | | |

L'analisi dei gel sintetici data l'alta stringenza dei gel stessi (100%) non permette di valutare in maniera effettiva variazioni qualitative o quantitative nell'espressione delle proteine dal momento

che sono automaticamente esclusi dal sintetico gli spot non condivisi da tutti i singoli gel di ciascun gruppo. Tuttavia essa ha consentito di restringere il campo d'analisi a 15 proteine la cui espressione sembra variare in maniera significativa nei gruppi.

IVb. ANALISI QUANTITATIVA DELLE PROTEINE DI INTERESSE

I dati preliminari hanno consentito di identificare 15 proteine espresse in maniera diversa nei gruppi in esame. Tali proteine sono elencate in Tabella 13 insieme all'analisi quantitativa della percentuale di volume ad esse relativa che è stata condotta misurando le singole percentuali di volume di ciascuno spot di interesse su ciascuno dei gel analitici di ogni gruppo e calcolandone media e deviazione standard.

Tabella 13. Media e deviazione standard della densità ottica delle proteine

| | Controllo sano | | SjS | | Sindrome secca | | Sclerodermia | | SSA | | SSA/SSB | |
|--------------------------|----------------|----------|----------|----------|----------------|----------|--------------|----------|---------|----------|---------|----------|
| | media | DS | media | DS | media | DS | media | DS | media | DS | media | DS |
| amilasi | 2.758571 | 1.049070 | 0.793333 | 0.434885 | 1.412000 | 0.598000 | 3.618000 | 3.120203 | 3.1067 | 2.301127 | 0.9500 | 0.532000 |
| PIP | 9.027143 | 3.641473 | 3.050000 | 2.033273 | 2.060000 | 2.738786 | 5.354000 | 1.742708 | 4.8433 | 1.836264 | 3.5680 | 3.801200 |
| albumina | 2.654286 | 0.627876 | 2.293000 | 2.016339 | 1.727500 | 0.991543 | 3.294000 | 1.229789 | 2.9140 | 1.200637 | 1.4260 | 0.800768 |
| cheratina 6L | 1.844000 | 0.510911 | 0.290000 | 0.485489 | 0.101000 | 0.174937 | 4.910000 | 1.307918 | 2.0325 | 1.607407 | 1.4125 | 1.984698 |
| actina | 0.661000 | 0.250000 | 1.340000 | 0.340000 | 1.236667 | 0.615911 | 0.690909 | 0.309207 | 0.99200 | 0.392173 | 0.9500 | 0.532466 |
| carbonato VI | 3.395714 | 1.375753 | 0.414000 | 0.625392 | 0.690000 | 0.283196 | 0.816000 | 0.578299 | 2.6025 | 2.244777 | 0.2260 | 0.311897 |
| cistatina SN | 4.764615 | 1.882947 | 1.419615 | 0.735749 | 0.967500 | 0.781340 | 6.127833 | 4.283895 | 2.3467 | 0.615169 | 3.4975 | 3.242452 |
| cistatina S | 2.086000 | 0.480240 | 0.735714 | 0.548266 | 0.462250 | 0.221447 | 1.501667 | 0.471950 | 1.2000 | 0.420535 | 0.3375 | 0.430842 |
| cistatina D | 0.734000 | 0.698000 | 0.527273 | 0.621741 | 0.517500 | 0.531311 | 1.640000 | 0.669925 | 0.7520 | 0.353935 | 1.1575 | 0.526712 |
| Imb. Elastasi leuc | 0.170000 | 0.020000 | 0.540000 | 0.110000 | 0.280000 | 0.226936 | 0.218333 | 0.094110 | 0.2470 | 0.40106 | 0.2840 | 0.240217 |
| lipocalina | 0.020000 | 0.056569 | 0.165000 | 0.110454 | 0.031667 | 0.077567 | nd | | nd | | nd | |
| ciclofillina A | nd | | 0.358000 | 0.110454 | 0.260000 | 0.109087 | 0.262857 | 0.089762 | 0.2467 | 0.064291 | 0.1800 | 0.17356 |
| calgranulina B | 0.091667 | 0.142887 | 2.442000 | 1.353706 | 1.890000 | 0.470957 | 3.302857 | 1.353067 | 1.7317 | 0.853379 | 2.6525 | 1.654476 |
| β 2 microglobulina | 0.580000 | 0.370135 | 1.793000 | 0.624000 | 0.887000 | 0.299070 | 1.112500 | 0.615090 | 0.5133 | 0.166693 | 1.08800 | 0.574000 |
| IgKc | 0.272000 | 0.177398 | 0.760000 | 0.214243 | 0.570000 | 0.203000 | 0.243333 | 0.230275 | 0.3645 | 0.194491 | 0.4400 | 0.229637 |

Il confronto delle medie della densità ottica nei gruppi è stato effettuato mediante test ANOVA e i risultati ottenuti sono riassunti in tabella 14.

Tabella 14. Test ANOVA per il confronto delle medie della densità ottica tra i gruppi

| | ANOVA su tutti i gruppi | Espressione nello SjS |
|---------------------------------|----------------------------|-----------------------|
| albumina | p=0,28 | invariata |
| amilasi | p=0,013 | ridotta |
| PIP | p=0.001 | ridotta |
| cheratina 6L | p=0,004 | ridotta |
| carbonato VI | p<0.0001 | ridotta |
| actina | p=0.001 | aumentata |
| cistatina SN | p<0.0001 | ridotta |
| cistatina S | p<0,0001 | ridotta |
| cistatina D | p=0,018 | ridotta |
| Inibitore elastasi leucocitaria | p<0,0001 | aumentato |
| lipocalina | p=0,003 | aumentata |
| ciclofillina A | p=? | aumentata |
| calgranulina B | p=0,001 | aumentata |
| β -2 microglobulina | p=0,0007 | aumentata |
| IgKc | p=0.0013 | aumentata |

Per chiarire il significato delle differenze osservate con il test ANOVA il confronto delle medie della densità ottica dei diversi spot rispetto alla SjS è stato effettuato mediante t-test di Student ed i risultati ottenuti sono riassunti in tabella 15.

Tabella 15. Risultati t-test confronto SjS verso controlli sani e patologici

| p- value (SjS vs..) | sano | sicca | sclero | SSA | SSA/SSB |
|---------------------------|-------------------|--------------|-------------------|---------------|-------------|
| albumina | 0,65 | 0,60 | 0,33 | 0,54 | 0,37 |
| amilasi | 0,0002 | 0,06 | 0,01 | 0,01 | 0,82 |
| PIP | 0,0009 | 0,45 | 0,05 | 0,10 | 0,74 |
| cheratina 6L | 0,0011 | 0,40 | <0,0001 | 0,06 | 0,25 |
| carbonato VI | <0,0001 | 0,42 | 0,25 | 0,01 | 0,54 |
| actina | <0,0001 | 0,69 | 0,0027 | 0,01 | 0,01 |
| cistatina SN | <0,0001 | 0,30 | 0,001 | 0,06 | 0,03 |
| cistatina S | 0,0013 | 0,37 | 0,02 | 0,14 | 0,24 |
| cistatina D | 0,51 | 0,97 | 0,003 | 0,46 | 0,09 |
| Inib. Elastasi leuc | 0,0001 | 0,007 | 0,0001 | 0,03 | 0,01 |
| lipocalina | 0,0056 | 0,02 | nd | nd | nd |
| ciclofillina A | nd | 0,20 | 0,137 | 0,18 | 0,07 |
| calgranulina B | 0,002 | 0,46 | 0,30 | 0,31 | 0,83 |
| β -2 microglobulina | 0,0025 | 0,023 | 0,045 | 0,0004 | 0,06 |
| IgKc | 0,0019 | 0,15 | 0,0015 | 0,005 | 0,04 |

La tabella 16 illustra, infine, i risultati del confronto tra i vari gruppi e i controlli sani.

Tabella 16. Risultati di confronto dei gruppi patologici verso il gruppo di controllo dei soggetti sani ricavati con il t-test di Student

| p- value (sano vs..) | SjS | sicca | sclero | SSA | SSA/SSB |
|---------------------------|-------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| albumina | 0,65 | 0,08 | 0,26 | 0,63 | 0,06 |
| amilasi | 0,0002 | 0,03 | 0,50 | 0,72 | 0,05 |
| PIP | 0,0009 | 0,0049 | 0,06 | 0,03 | 0,01 |
| cheratina 6L | 0,0011 | 0,0014 | 0,001 | 0,33 | 0,42 |
| carbonato VI | <0,0001 | 0,0042 | 0,003 | 0,47 | 0,0005 |
| actina | <0,0001 | 0,023 | 0,8 | 0,06 | 0,18 |
| cistatina SN | <0,0001 | 0,0015 | 0,34 | 0,06 | 0,33 |
| cistatina S | 0,0013 | 0,0004 | 0,07 | 0,01 | 0,0008 |
| cistatina D | 0,51 | 0,59 | 0,03 | 0,95 | 0,31 |
| Inib. Elastasi leuc | 0,0001 | 0,11 | 0,11 | 0,11 | 0,12 |
| lipocalina | 0,0056 | 0,7 | nd | nd | nd |
| calgranulina B | 0,002 | 0,0001 | 0,0001 | 0,0009 | 0,005 |
| β -2 microglobulina | 0,002 | 0,22 | 0,11 | 0,69 | 0,13 |
| IgKc | 0,0019 | 0,03 | 0,82 | 0,43 | 0,25 |

V. DISCUSSIONE

I risultati ottenuti hanno permesso di mettere in evidenza numerose differenze tra il pattern proteico salivare dei pazienti con SjS ed i profili proteici salivari dei soggetti sani e dei controlli patologici.

In particolare nello studio sono state valutate le differenze relative all'espressione delle seguenti proteine salivari:

- proteine salivari acinari (albumina, α -amilasi salivare, PIP, cheratina 6L, anidrase carbonica VI).
- proteine infiammatorie e legate all'autoimmunità (calgranulina B, ciclofillina A, catena leggera κ delle immunoglobuline, beta2-microglobulina)
- proteine coinvolte nell'equilibrio proteasi / antiproteasi (cistatine D, S, SN e loro precursori, inibitore dell'elastasi leucocitaria)
- proteine coinvolte nel danno tissutale (actina, lipocalina-1 precursore)

Il profilo di espressione delle proteine salivari prodotte a livello acinare appare modificato nei pazienti con SjS rispetto ai controlli sani con una riduzione dell'intensità ottica dello spot principale dell'albumina e degli spot dell' α -amilasi salivare, della PIP, della cheratina 6L e della carbonato anidrase VI. E' possibile osservare una riduzione dell'espressione delle suddette proteine acinari (seppure ai limiti della significatività statistica) anche nei profili proteici salivari dei controlli patologici, secondo un gradiente che avvicina i pazienti con SjS a quelli con sindrome sicca idiopatica e ai soggetti asintomatici con anticorpi anti-RoSSA/+ anti-La/SSB e, viceversa, i controlli sani ai soggetti affetti da sclerodermia e ai portatori asintomatici di anti-Ro/SSA. I dati ottenuti sono in linea con gli studi della letteratura che documentano nella saliva dei pazienti con SjS una riduzione dell' α -amilasi salivare e della carbonato deidrogenasi VI (81). Le ipotesi proposte per giustificare la ridotta espressione delle proteine suddette sono fondamentalmente quelle della frammentazione proteica aumentata e quella di una ridotta produzione da danno acinare. La prima ipotesi può giustificare in maniera relativamente lineare la riduzione dello spot principale dell'albumina nei pazienti con SjS: quando esso viene sommato ai frammenti di albumina identificati alla spettrometria di massa, la densità degli spot totali dell'albumina non risulta statisticamente differente nel confronto tra i pazienti con SjS e tutti gli altri gruppi in studio. Anche la riduzione della PIP potrebbe essere correlata sia ad una ridotta

produzione che allo stato di infiammazione subclinica cronica del cavo orale dal momento che nel confronto con i controlli sani essa si riduce in particolare nei soggetti con SjS e con sindrome secca. La PIP è, infatti, una proteina di secrezione presente nella saliva in forma glicosilata e non glicosilata la cui funzione seppure in larga parte ancora da chiarire, sembra essere quella di legarsi ad altre proteine come il fibrinogeno, l'actina, la cheratina, la miosina e la tropomiosina. La PIP si lega anche all'idrossiapatite, componente principale della pellicola dei denti e sembra capace di legarsi ai batteri del cavo orale svolgendo un ruolo potenziale nell'immunità innata e nella difesa delle mucose (104). La riduzione della PIP che è stata evidenziata potrebbe, pertanto, essere analoga a quella della PIP lacrimale descritta nei pazienti con blefarite cronica. Altre due proteine ricche in prolina, che si riducono nei controlli patologici sono l' α -amilasi salivare e la carbonato deidrogenasi VI, la prima è un'idrolasi coinvolta nella digestione buccale dell'amido, la seconda nell'idratazione reversibile del diossido di carbonio e, di conseguenza, nel mantenimento dell'omeostasi del pH salivare. La riduzione della carbonato deidrogenasi è probabilmente la più eclatante al punto che gli spots (es.n° 26-29) che l'identificano sono addirittura mancanti nel gel sintetico dei soggetti con SjS. Il risultato può giustificare anche la tendenza del pH salivare dei pazienti con SjS ad essere complessivamente più basso (pH 6.75 ± 0.41) che nei controlli sani (pH 7.00 ± 0.48). Nel dettaglio nei gel dei soggetti sani è stato possibile identificare tre diversi spots per la carbonato deidrogenasi VI, probabilmente correlabili a isoforme dell'enzima, mentre nei singoli gel dei pazienti con SjS è stato possibile documentarne o una marcata riduzione o addirittura la non espressione. Questo dato è in linea con quanto recentemente pubblicato in letteratura in cui è stata documentata una riduzione dell'espressione del gene della carbonato deidratasi VI nelle ghiandole salivari minori dei pazienti con SjS (105). Una riduzione della carbonato deidrogenasi VI è in realtà evidenziabile anche nei soggetti con sindrome secca, con sclerodermia e nei portatori asintomatici di anti-Ro/SSA+ anti-La/SSB, mentre i valori di densità dei portatori degli anti-Ro/SSA sono sovrapponibili ai controlli sani. Infine, sempre nell'ambito dell'espressione delle proteine acinari, lo studio ha permesso di documentare una riduzione nell'espressione della cheratina 6L nei soggetti con SjS e sindrome secca ed uno spiccato aumento della stessa nei pazienti con Sclerodermia ($p < 0,0001$), verosimilmente in relazione al processo fibrotico che caratterizza la malattia. Complessivamente, con l'eccezione della cheratina, relativamente all'espressione delle proteine acinari si conferma quindi lo spettro di riduzione che ha ai due estremi i gel dei pazienti con SjS e i controlli sani. I soggetti con sindrome secca idiopatica e quelli con

anticorpi anti-Ro/SSA+ anti-La/SSB sono più simili ai pazienti con SjS, i pazienti con sclerodermia e quelli con anti-Ro/SSA ai controlli sani.

Accanto alle modificazioni nei livelli di espressione delle proteine salivari tipiche, il pattern proteico salivare dei pazienti con SjS presenta una combinazione di proteine pro-infiammatorie e legate al sistema immunitario. In realtà, proteine infiammatorie come la calgranulina B e la ciclofillina A, sono espresse in maniera aumentata, e non significativamente diversa che nello SjS, anche nei profili salivari dei pazienti con sindrome secca, sclerodermia e autoanticorpi anti-Ro/SSA e anti-Ro/SSA + anti La/SSB. assumendo quindi un significato aspecifico. La ciclofillina A è il prototipo di una famiglia di proteine altamente conservate, coinvolte in molti processi biologici come l'espressione, l'assemblamento e la degradazione delle proteine. Nell'ambito dei processi di flogosi la ciclofillina A sembra agire con meccanismo autocrino e paracrino, come attivatore delle cellule endoteliali contribuendo all'attivazione immuno-mediata e alla disfunzione endoteliale. La calgranulina B, invece, appartiene alla famiglia S100 delle proteine leganti il calcio ed è noto che viene espressa sia nei processi di flogosi acuta che nei processi di flogosi cronica. A differenza della calgranulina B e della ciclofillina A, i pazienti con SjS presentano un aumento statisticamente significativo, rispetto agli altri gruppi di pazienti, della beta-2 microglobulina e dell'espressione della catena leggera κ delle immunoglobuline. Questo risultato, può riflettere l'attivazione policlonale, sistemica e salivare, dei linfociti B nella sindrome di SjS e conferma, anche in questo caso, precedenti osservazioni della letteratura (40, 81).

Un ulteriore elemento peculiare del pattern salivare dei pazienti con SjS presente solo nei soggetti con sindrome secca idiopatica e non nei controlli sani nè nei pazienti con sclerodermia anti-Ro/SSA e anti-Ro/SSA + anti-La/SSB, concerne l'alterazione del bilancio tra proteasi e anti-proteasi salivari. Il dato più rilevante è a carico delle cistatine, S e SN. Le cistatine sono proteine inibitrici delle cistein-proteinasi che svolgono il ruolo di proteggere i tessuti da un'attivazione di sregolata delle proteinasi stesse. Le cistatine sono espresse in una ampia varietà di isoforme che possono differenziarsi per il grado di fosforilazione e/o glicosilazione. Nello studio la loro marcata riduzione può riflettere un consumo da parte delle proteasi considerando la variazione consensuale nella SjS e nelle sindromi sicche idiopatiche della cistatina SN e della S. La cistatina D non sembra presentare modificazioni significative nei pazienti con SJS rispetto ai controlli sani e agli altri gruppi patologici, con l'eccezione della Sclerodermia nella quale i livelli di cistatina D sembrano essere aumentati. Nell'ambito delle alterazioni presentate dal sistema degli

inibitori delle proteasi si osserva, inoltre, in modo peculiare nei pazienti con SjS, un aumento nei livelli di espressione di altre proteine inibitrici di proteasi salivari come la proteina inibitrice dell'elastasi leucocitaria. Questa proteina appartiene alla famiglia delle proteine inibitrici delle serin-proteasi e regola in primis l'attività delle proteasi dei neutrofili /elastasi, catepsina G e proteinasi 3. Il significato ultimo dello squilibrio osservato e la preponderante espressione delle proteine inibitrici le serin-proteasi sulle cistein-proteasi rimane in larga parte da chiarire.

Infine, in generale, nella saliva dei pazienti con SjS si osserva un'ampia espressione di proteine coinvolte nel danno tissutale sia come effettori del danno che come fattori di protezione nei confronti del danno tissutale stesso. Tra esse è stato possibile osservare, nello studio, l'aumento dell'actina e della lipocalina-1. L'actina aumenta in maniera statisticamente significativa nei pazienti con SjS e con sindrome sicca idiopatica mentre la lipocalina-1 solo nei pazienti con SjS. L'actina è una proteina del citoscheletro contenuta in tutti gli elementi cellulari. Un aumento della concentrazione salivare dell'actina è descritto anche nei pazienti con mucositi correlate a radioterapia per neoplasie del cavo orale ed è quindi considerato come marker aspecifico di danno del cavo orale. La lipocalina-1 è, invece, una proteina che agisce come scavenger fisiologico delle molecole che derivano dalla per ossidazione lipidica ma anche come inibitore delle serin-proteasi. Il suo aumento significativo nella saliva dei pazienti con SjS rimane ancora da chiarire ed appare particolarmente interessante considerando che recentemente la lipocalina-1 è stata identificata come potenziale autoantigene nelle lacrime dei pazienti affetti da SjS (106).

VI. CONCLUSIONI

Questo studio ha permesso di caratterizzare mediante analisi proteomica il profilo proteico della saliva dei pazienti con SjS confrontando il pattern ottenuto non solo con quello dei controlli sani ma anche rispetto ai diversi pattern di un gruppo eterogeneo di controlli patologici: pazienti con flogosi cronica del cavo orale ad eziologia non immune, pazienti con malattia autoimmune sistemica e pazienti con profilo autoanticorpale patologico analogo a quello dei pazienti con sindrome di Sjogren ma asintomatici per quanto relativo alla secchezza orale e oculare. I risultati ottenuti, seppure preliminari, hanno mostrato come il profilo proteico salivare dei pazienti con SjS risulti estremamente complesso e presenti aspetti peculiari che in parte riflettono l'impegno flogistico selettivo da parte della malattia delle ghiandole salivari, in parte riflettono le alterazioni del microambiente orale che essa induce e in parte, infine, la natura autoimmune sistemica della SjS. L'analisi a confronto delle modificazioni subite dal pattern proteico salivare normale, nella SjS e nelle altre diverse situazioni patologiche, ha permesso di focalizzare l'attenzione, in particolare, su 15 proteine (albumina, amilasi, proteina inducibile la prolattina, cheratina 6 L, carbonato deidrogenasi VI, cistatina SN, S, D, inibitore dell'elastasi leucocitaria, actina, lipocalina, ciclofillana A, calgranulina B, beta-2-microglobulina e catena leggera kappa delle Ig) e di speculare sull'eziopatogenesi delle modificazioni osservate.

Complessivamente nella SjS si osserva una marcata riduzione delle proteine a secrezione acinare (albumina, amilasi, proteina inducibile la prolattina, cheratina 6 L, carbonato deidrogenasi VI), una riduzione delle cistatine ed un incremento delle proteine inibitrici delle serin proteasi, un aumento delle proteine infiammatorie e delle proteine legate al danno tissutale (actina) ma soprattutto, in maniera specifica, un incremento nell'espressione della beta-2-microglobulina e della catena leggera kappa delle immunoglobuline, riconducibili all'attivazione B cellulare a livello ghiandolare ed un incremento della lipocalina, proteina scavenger, sospettata di svolgere ruolo di autoantigene a livello lacrimale. L'insieme delle alterazioni osservate suggerisce che il dosaggio dei livelli salivari di un numero limitato di proteine, identificate tramite analisi proteomica, possa costituire un valido ausilio nella diagnosi di malattia, configurando una sorta di algoritmo proteico da applicare soprattutto nei casi che rimangono dubbi nelle indagini di diagnostica tradizionale. In conclusione, quindi, seppure a livello preliminare, lo studio ha mostrato come l'analisi proteomica di fluidi biologici, scarsamente complessi

e facilmente reperibili come la saliva, possa rappresentare un'arma utile ed efficace nella diagnosi delle malattie reumatiche, in generale, e della SjS in particolare.

VII. BIBLIOGRAFIA

1. Ramos-Casals M., Tzioufas AG., Font J. Primary Sjogren's syndrome: new clinical and therapeutic concepts. *Ann Rheum Dis* 2005; 64: 347-354
2. Fox RJ. Sjogren's Syndrome. *Lancet* 2005; 366:321-331
3. Thomas E., Hay EM., Hajeer A., Silman AJ. Sjogren's syndrome: a community-based study of prevalence and impact. *Br J Rheumatol* 1998; 37: 1069-1076
4. Pillemer SR., Matteson EL., Jacobsson LT. Incidence of Physician-diagnosed primary Sjogren's syndrome in residents of Olmsted County, Minnesota. *Mayo Clin Proc* 2001; 76; 593-99
5. Bowman SJ., Ibrahim GH., Holmes G., Hamburger J., Ainsworth JR. Estimating the prevalence among Caucasian women of primary Sjogren's syndrome in two general practises in Birmingham, UK. *Scand J Rheumatol* 2004; 33:39-43
6. Trontzas PI., Andrianakos AA. Sjogren's syndrome: a population based study of prevalence in Greece. The ESORDIG study. *Ann Rheum Dis* 2005; 64: 1240-1241
7. Vitali C., Bombardieri S., Jonsson R., Moutsopoulos HM., Alexander EL, Carson SE., et al. Classification Criteria for Sjogren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. *Ann Rheum Dis* 2002; 61:554-8
8. Theander E., Manthorpe R., Jacobsson THL. Mortality and causes of death in primary Sjogren's syndrome. A Prospective cohort study. *Arthritis Rheum* 2004; 50:1262-1269
9. Arnett F. Histocompatibility typing in the rheumatic diseases: diagnostic and prognostic implications. *Med Clin North Am* 1994; 20: 371-87
10. Delaleu N, Jonsson R., Koller MM. Sjogren's syndrome. *Eur J Oral Sci* 2005; 113:101-113
11. Triantafyllopoulou A., Moutsopoulos HM. Autoimmunity and Coxsackievirus Infection in Primary Sjögren's Syndrome. *Ann N.Y. Acad Sci* 2005; 1050: 389–396
12. Skopouli FN., Moutsopoulos HM. Autoimmune epithelitis : Sjogren's syndrome. *Clin Exp Rheumatol*1994 ; 12(S11): 9-11
13. Mitsias DI, Tzioufas AG, Veiopoulou C, et al.: The Th1/Th2 cytokine balance changes with the progress of the immunopathological lesion of Sjögren's syndrome. *Clin Exp Immunol* 2002, 128:562–568.
14. Ogawa N., Ping L., Zhenjun L., Takada Y., Sugai S. Involvement of the interferon-gamma-induced T cell-attracting chemokines, interferon-gamma-inducible 10-kd protein

- (CXCL10) and monokine induced by interferon-gamma (CXCL9), in the salivary gland lesions of patients with Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 2002; 46:2730-41
15. Salomonsson S., Larsson P., Tengner P., Mellquist E., Hjelmstrom P., Wahren-Herlenius M. Expression of the B cell-attracting chemokine CXCL13 in the target organ and autoantibody production in ectopic lymphoid tissue in the chronic inflammatory disease Sjogren's syndrome. *Scand J Immunol.* 2002;55:336-42.
16. Youinou P., Daridon C., Saraux A., Devauchelle V., Pers JO. Is B-cell the conductor of the lymphocyte orchestra in the salivary glands of patients with primary Sjögren's syndrome. *Clin Exp Rheumatol* 2006; 24: 491-492.
17. Bolstad AI., Eiken HG., Rosenlund B., et al.: Increased salivary gland tissue expression of Fas, Fas ligand, cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4, and programmed cell death 1 in primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 2003; 48:174–185.
18. Fox RI., Stern M.: Sjögren's syndrome: mechanisms of pathogenesis involve interaction of immune and neurosecretory systems. *Scand J Rheumatol* 2002; 116:3–13.
19. Beroukas D., Hiscock J., Gannon BJ., et al.: Selective down-regulation of aquaporin-1 in salivary glands in primary Sjögren's syndrome. *Lab Invest* 2002; 82:1547–1552.
20. Hansen A., Lipsky PE., Dorner T. New concepts in the pathogenesis of Sjögren syndrome: many questions, fewer answers. *Curr Opin Rheumatol* 2003; 15:563–570
21. Dawson LJ., Stanbury J., Venn N., Hasdimir B., Rogers SN., Smith PM. Antimuscarinic Antibodies in Primary Sjögren's Syndrome Reversibly Inhibit the Mechanism of Fluid Secretion by Human Submandibular Salivary Acinar Cells. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 1165–1173
22. Skopouli FN., Dafni U., Ioannidis JP., Moutsopoulos HM. Clinical evolution, and morbidity and mortality of primary Sjogren's syndrome. *Semin Arthritis Rheum* 2000; 29:296-304
23. Rolando M. Sjogren's syndrome as seen by an ophthalmologist. *Scand J Rheumatol* 2001; S115: 27-33
24. Soto-Rojas AE., Kraus A. The oral side of Sjogren's syndrome. Diagnosis and treatment. A Review. *Arch Med Research* 2002; 33:95-106
25. Hamburger J. Sjogren's syndrome as seen by an oral physician. *Scand J Rheumatol* 2001; S115: 34-39
26. Ramos-Casals M., Font J., Garcia-Carrasco M., Brito MP., Rosas J., Calvo-Alen J et al. Primary Sjogren syndrome: hematologic patterns of disease expression. *Medicine (Baltimore)* 2002; 81: 281-292

27. Tsioufas AG., Boumba DS., Skopouli FN., Moutsopoulos HM. Mixed monoclonal cryoglobulinemia and monoclonal rheumatoid factor cross-reactive idiotypes as predictive factors for the development of lymphoma in primary Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1996; 39: 767-772
28. Voulgarelis M., Dafni UG., Isenberg DA., Moutsopoulos HM. Malignant lymphoma in primary Sjogren's syndrome: a multicenter, retrospective, clinical study by the European Concerted Action on Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1999; 42: 1765-1772
29. Baldini C., Tavoni A., Merlini G., Sebastiani M., Bombardieri S. Sindrome di Sjogren primitiva: descrizione clinica e sierologica di una casistica monocentrica. *Reumatismo*, 2005; 57(4):256-261
30. Praprotnik S., Bozic B., Kveder T., Rozman B. Fluctuation of anti-Ro/SSA antibody levels in patients with systemic lupus erythematosus and Sjogren's syndrome: a prospective study. *Clin Exp Rheumatol* 1999; 17:63-68
31. Lochte H, Pelck R., Manthorpe R. Clinical manifestations correlated to the prevalence of autoantibodies in a large cohort of patients with primary Sjogren's syndrome. A comparison of patients initially diagnosed according to the Copenhagen classification criteria with the American-European consensus criteria. *Autoimmun Rev* 2005; 4:276-281
32. Meyer O. Anti-SSA/Ro and anti-SSB/La antibodies. What's new? *Ann Med Interne (Paris)*. 2002;153:520-9
33. Ulbricht KU., Schmidt RE., Witte T. Antibodies against alpha-fodrin in Sjogren's syndrome. *Autoimmun Rev* 2003; 2: 109-113
34. Vitali C, Bombardieri S., Moutsopoulos HM., Balestrieri G., Bencivelli W., Bernstein RM., Bjerrum KB., Braga S., Coll J., de Vita S., et al. Preliminary criteria for the classification of Sjogren's syndrome. Results of a prospective concerted action supported by the European Community. *Arthritis Rheum* 1993; 36:340- 347.
35. Vitali C., Moutsopoulos HM., Bombardieri S. The European Community Study Group on diagnostic criteria for Sjogren's syndrome. Sensitivity and specificity of tests for ocular and oral involvement in Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 1994; 53: 637-647
36. Vivino FB., Gala I. Hermann GA. Change in Final Diagnosis on Second Evaluation of Labial Minor Salivary Gland Biopsies. *J. Rheumatol* 2002; 29: 938-944
37. Greenspan JS, Daniels TE, Talal N, Sylvester RA. The histopathology of Sjogren's syndrome in labial salivary gland biopsies. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1974; 37: 217-229

38. Daniels TE. Labial salivary gland biopsy in Sjogren's syndrome. Assessment as a diagnostic criterion in 362 suspected cases. *Arthritis Rheum* 1984; 27:147-156
39. Pijpe J., Kalk WWI., Bootsma H., Spijkervet FKL., Kallenberg CGM., Vissink A. Progression of salivary gland dysfunction in patients with Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 2007;66: 107-112
40. Stuchell RN., Mandel ID., Baumhart H. Clinical utilization of sialochemistry in Sjogren's syndrome. [J Oral Pathol](#). 1984;13:303-309
41. Cuida M., Halse AK., Johannessen AC., Tynning T., Jonsson R. Indicators of salivary gland inflammation in primary Sjogren's syndrome. *Eur J Oral Sci*. 1997;105:228-33.
42. van der Reijden WA., van der Kwaak JS., Veerman EC., Nieuw Amerongen AV. Analysis of the concentration and output of whole salivary constituents in patients with Sjogren's syndrome. *Eur J Oral Sci*. 1996;104: 335-340
43. Moutsopoulos HM, Karsh J, Wolf RO, Tarpley TM, Tylden A, Papadopoulos NM. Lysozyme determination in parotid saliva from patients with Sjogren's syndrome. *Am J Med* 1980; 69:39-42
44. Jezequel N., Depasse F., Jouquan J., Lelong A., Roncin S., Pare G., Pennec YL., Youinou P. Salivary lactoferrin in primary Sjogren's syndrome. *Clin Exp Rheumatol*. 1989;7:123-5
45. Sreebny L., Zhu WX. Whole saliva and the diagnosis of Sjogren's syndrome: an evaluation of patients who complain of dry mouth and dry eyes. Part 1: Screening tests. *Gerodontology*. 1996;13:35-43
46. Wu AJ, Lafrenie RM, Park C et al. Modulation of MMP-2 (gelatinase A) and MMP-9 (gelatinase B) by interferon-gamma in a human salivary gland cell line. *J Cell Physiol* 1997;171:117-24.
47. Hernandez CC, Donadi EA, Reis ML. Kininogen-kallikrein-kinin system in plasma and saliva of patients with Sjogren's syndrome. *J Rheumatol* 1998;25:2381-4.
48. Kalk WWI., Vissink A., Stegenga B., Bootsma H., Nieuw Amerongen AV., Kallenberg CGM. Sialometry approach for diagnosing Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 2002;61;137-144
49. Choudhary J., Grant SGN. Proteomics in postgenomic neuroscience: the end of the beginning. *Nature Neuroscience* 2004; 5: 440-445.
50. Godovac-Zimmermann J., Soskic V., Poznanovic S., Brianza F. Functional proteomics of signal transduction by membrane receptors. *Electrophoresis* 1999; 20: 952-961.

51. Imam-Sghiouar N., Laude-Lemaire I., Labas V., Pflieger D., Le Caer JP., Caron M., Nabias DK., Joubert-Caron R. Subproteomics analysis of phosphorylated proteins: application to the study of B-lymphoblast from a patient with Scott syndrome. *Proteomics* 2002; 2: 828-838.
52. Graves PR., Haystead ATJ. *Molecular Biologist's Guide to Proteomics Microbiology and Molecular Biol Rev* 2002; 66: 39-63
53. Pandey A., Mann M. Proteomics to study genes and genomes. *Nature* 2000; 405: 837-846.
54. Phizicky E., Bastiaens PI., Zhu H., Snyder M., Fields S. Protein analysis on a proteomic scale. *Nature* 2003; 422: 208-215.
55. Berkelman T., Stenstedt T. 2-D Electrophoresis, using immobilized pH gradients. *Principles and Methods*. Amersham Biosciences 2002; 17-22.
56. Klose J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutation in mammals. *Humangenetik* 1975; 26: 231-243.
57. Gorg A., Postel W., Gunther S., Weser J. Improved horizontal two-dimensional electrophoresis with hybrid isoelectric focusing in immobilized pH gradients in the first dimension and laying-on transfer to the second dimension. *Electrophoresis* 1985; 6: 599-604.
58. Sanchez JC., Rouge V., Pisteur M., Ravier F., Tonella L., Moosmayer M., Wilkins MR., Hochstrasser DF. "Improved and simplified in-gel sample application using reswelling of dry immobilized pH gradients". *Electrophoresis* 1997; 18: 324-327.
59. Candiano G., Bruschi M., Musante L., Santucci L., Ghiggeri GM., Carnemolla B., Orecchia P., Zardi L., Righetti PG. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis* 2004; 25: 1327-1333.
60. Wilkins MR., Williams KL., Appeal RD., Hochstrasser DF. *Proteome research: new frontiers in functional genomics*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg 1997; 1-12.
61. Godovac-Zimmermann J., Brown L. *Perspectives for Functional Proteomics and Mass Spectrometry*. *Mass. Spec. Reviews*, 2001, 20: 1-57
62. Aebersold R., Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 2003; 422: 198-207
63. Fusaro VA., Stone JH. Mass spectrometry-based proteomics and analyses of serum: a primer for the clinical investigator. *Clin Exp Rheumatol*. 2003; 21(S32):S3-14

64. Westermier R., Loland S., Asbury R. La tecnologia proteomica. *Journal of Clinical ligand assay*. 2002. 25: 250-260
65. Bonk T., Humeny A. MALDI-TOF-MS Analysis of Protein and DNA. *The Neuroscientist* 2001; 1: 6-12
66. Langen H., Berndt P., Roder D., Cairns N., Lubec G., Fountoulakis M. Two-dimensional map of human brain proteins". *Electrophoresis* 1999; 20: 907-916.
67. Husi H., Grant SGN. Proteomics of the nervous system. *Trends in Neurosciences* 2001; 5: 259-266
68. Humphrey SP., Williamson RT. A review of saliva: Normal composition, flow, and function. *The journal of prosthetic dentistry* 2001; 85: 162-169.
69. Amado FML., Vitorino RMP., Domingues PMDN., Lobo MJC., Duarte JAR. Analysis of the human saliva proteome. *Expert Rev Proteomics* 2005; 2:521-539
70. Kaufman E., Lamster IB. The diagnostic application of saliva-a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002; 13: 197-212.
71. Drake RR., Cazare LH., Semmes OJ., Wadsworth JT. Serum, salivary and tissue proteomics for discovery of biomarkers for head and neck cancers. *Expert Rev Mol Diagn.* 2005;5:93-100.
72. Huang CM. Comparative proteomic analysis of human whole saliva. *Arch Oral Biol* 2004; 49: 951-962
73. Vitorino R., Lobo M. J., Ferrer-Correira A. J., Dubin, J. R., Tomer K. B., Domingues, P. M., Amado F. M. Identification of human whole saliva protein components using proteomics. *Proteomics* 2004; 4: 1109 -1115
74. Hirtz C., Chevalier F., Centeno D., Egea JC., Rossignol M., Sommerer N., de Périère D. Complexity of the human whole saliva proteome. *J Physiol Biochem* 2005; 61: 469-480
75. Yao Y., Berg EA., Costello CE., Troxler RF, Oppenheim FG Identification of Protein Components in Human Acquired Enamel Pellicle and Whole Saliva Using Novel Proteomics Approaches 2003; 278: 5300-5308
76. Kojima T., Andersen E., Sanchez J. C., Wilkins M. R., Hochstrasser D. F., Pralong W. F., Cimasoni G. Human gingival crevicular fluid contains MRP8 (S100A8) andMRP14 (S100A9), two calcium-binding proteins of the S100 family. *J Dent. Res.* 2000; 79: 740-747.
77. Hardt M, Thomas LR., Dixon SE., Newport G., Agabian N., Prakobphol A., Hall SC., Witkowska HE., Fisher SJ. Toward Defining the Human Parotid Gland Salivary Proteome

and Peptidome Identification and Characterization Using 2D SDS-PAGE, Ultrafiltration, HPLC and Mass Spectrometry. *Biochemistry* 2005; 44: 2885-2899

78. Hu S., Denny P., Xie Y., Loo JA., Wolinsky LE., Li Y., McBride J., Ogorzalek Loo RR., Navazesh M., Wong DT. Differentially expressed protein markers in human submandibular and sublingual secretions. *Int J Oncol* 2004; 25:1423-30.

79. Yang LL., Liu XQ., Liu W., Cheng B., Li MT. Comparative analysis of whole saliva proteomes for the screening of biomarkers for oral lichen planus. *Inflamm Res* 2006; 55:405-7

80. Wong DT. Salivary diagnostics for oral cancer. *J Calif Dent Assoc* 2006;34:303-8

81. Ryu OH., Atkinson JC., Hoehn GT., Illei GG., Hart TC. Identification of parotid salivary biomarkers in Sjogren's syndrome by surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and two-dimensional difference gel electrophoresis. *Rheumatology (Oxford)* 2006;45:1077-86.

82. Hermansson M., Sawaji Y., Bolton M., Alexander S., Wallace A., Begum S., Wait R., Saklatvala J. Proteomic analysis of articular cartilage shows increased type II collagen synthesis in osteoarthritis and expression of inhibin betaA (activin A), a regulatory molecule for chondrocytes. *J Biol Chem* 2004; 279:43514-21

83. De Ceuninck F., Marcheteau E., Berger S., Caliez A., Dumont V., Raes M., Anract P., Leclerc G., Boutin JA., Ferry G. Assessment of some tools for the characterization of the human osteoarthritic cartilage proteome. *J Biomol Tech* 2005;16: 256-65.

84. Ruiz-Romero C., Lopez-Armada MJ., Blanco FJ. Proteomic characterization of human normal articular chondrocytes: a novel tool for the study of osteoarthritis and other rheumatic diseases. *Proteomics* 2005;5:3048-59.

85. Sinz A., Bantscheff M., Mikkat S., Ringel B., Drynda S., Kekow J., Thiesen HJ, Glocker MO. Mass spectrometric proteome analyses of synovial fluids and plasmas from patients suffering from rheumatoid arthritis and comparison to reactive arthritis or osteoarthritis. *Electrophoresis* 2002; 23:3445-56

86. Liao H., Wu J., Kuhn E., Chin W., Chang B, Jones MD., O'Neil S., Clauser KR., Karl J., Hasler F., Roubenoff R., Zolg W., Guild BC. Use of mass spectrometry to identify protein biomarkers of disease severity in the synovial fluid and serum of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2004;50:3792-803

87. Drynda S., Ringel B., Kekow M., Kuhne C., Drynda A., Glocker MO., Thiesen HJ., Kekow J. Proteome analysis reveals disease-associated marker proteins to differentiate RA

- patients from other inflammatory joint diseases with the potential to monitor anti-TNFalpha therapy. *Pathol Res Pract* 2004;200:165-71
88. de Seny D., Fillet M., Meuwis MA., Geurts P., Lutteri L., Ribbens C., Bours V., Wehenkel L., Piette J., Malaise M., Merville MP. Discovery of new rheumatoid arthritis biomarkers using the surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry ProteinChip approach. *Arthritis Rheum* 2005; 52:3801-12
89. An Y., Pu H., He SZ., Li ZG. Identification of biomarkers in serum of early rheumatoid arthritis by proteomic methods *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2005;85:1261-5
90. Tilleman K., Van Beneden K., Dhondt A., Hoffman I., De Keyser F., Veys E., Elewaut D., Deforce D. Chronically inflamed synovium from spondyloarthropathy and rheumatoid arthritis investigated by protein expression profiling followed by tandem mass spectrometry. *Proteomics*. 2005; 5:2247-57
91. Miyamae T., Malehorn DE., Lemster B., Mori M., Imagawa T., Yokota S., Bigbee WL., Welsh M., Klarskov K., Nishimoto N, Vallejo AN., Hirsch R. Serum protein profile in systemic-onset juvenile idiopathic arthritis differentiates response versus nonresponse to therapy. *Arthritis Res Ther* 2005;7:R746-55.
92. Tomosugi N., Kitagawa K., Takahashi N., Sugai S., Ishikawa I. Diagnostic potential of tear proteomic patterns in Sjogren's syndrome. *J Proteome Res* 2005;4:820-5.
93. Stone JH., Rajapakse VN., Hoffman GS., Specks U., Merkel PA., Spiera RF., Davis JC., St Clair EW., McCune J., Ross S., Hitt BA., Veenstra TD., Conrads TP., Liotta LA., Petricoin EF 3rd; Wegener's Granulomatosis Etanercept Trial Research Group. A serum proteomic approach to gauging the state of remission in Wegener's granulomatosis. *Arthritis Rheum* 2005;52:902-910.
94. Fietta A., Bardoni A., Salvini R., Passadore I., Morosini M., Cavagna L., Codullo V., Pozzi E., Meloni F., Montecucco C. Analysis of bronchoalveolar lavage fluid proteome from systemic sclerosis patients with or without functional, clinical and radiological signs of lung fibrosis. *Arthritis Res Ther*. 2006; 8:R160
95. Atzeni F., Bardoni A., Cutolo M., Hunzelmann N., Krieg T., Martini G., Montecucco C., Olski TM., Secchi ME., Valentini G., Zulian F., Sarzi-Puttini P. Localized and systemic forms of scleroderma in adults and children. *Clin Exp Rheumatol* 2006; 24 (S 40):S36-45
96. Denton CP., Black CM., Abraham DJ. Mechanisms and consequences of fibrosis in systemic sclerosis. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2006; 2:134-144
97. Hummers LK. Microvascular damage in systemic sclerosis: detection and monitoring with biomarkers. *Curr Rheumatol Rep* 2006;8:131-137

98. Mason GI., Hamburger J., Matthews JB. Mast cells, extracellular matrix components, TGF β isoforms and TGF β receptor expression in labial salivary glands in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2000; 59:183-189
99. Chisolm DM et al. Labial salivary gland biopsy in Sjogren's syndrome. *Clin Pathol* 1968; 21:656-60
100. Subcommittee for Scleroderma Criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and therapeutic Criteria Committee. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum* 1980; 23: 581-590
101. Peterson GL. Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. *Anal Biochem* 1979; 100: 201-220
102. Baldini C., Giusti L., Bazzichi L., Lucacchini A., Ciregia F., Tavoni A., Bombardieri S.. Analisi Proteomica della saliva nei pazienti con Sindrome di Sjogren primitiva. *Reumatismo* 2006, 58(3)
103. Giusti L, Baldini C, Bazzichi L., Ciregia F., Tonazzini I., Mascia G., Giannaccini G., Bombardieri S., Lucacchini A. Siena Proteomics Proceedings. Proteome analysis of whole saliva: a new tool for rheumatic diseases - the example of Sjögren's syndrome. in press
104. Mirels L., Hand AR., Branin HJ. *J Histochem Cytochem* 1998; 46: 1061-1071
105. Kivela J., Parkkila S., Parkkila AK., Leinonen J., Rajaniemi H. Salivary carbonic anhydrase isoenzyme Vi. *J Physiol* 1999; 520: 315-320
106. Navone R., Lunardi C., Gerli R., Tinazzi E., Peterlana D., Bason C., Corrocher R., Puccetti A. Identification of tear lipocalin as a novel autoantigen target in Sjogren's syndrome. *J Autoimmun* 2005; 25: 229-234.

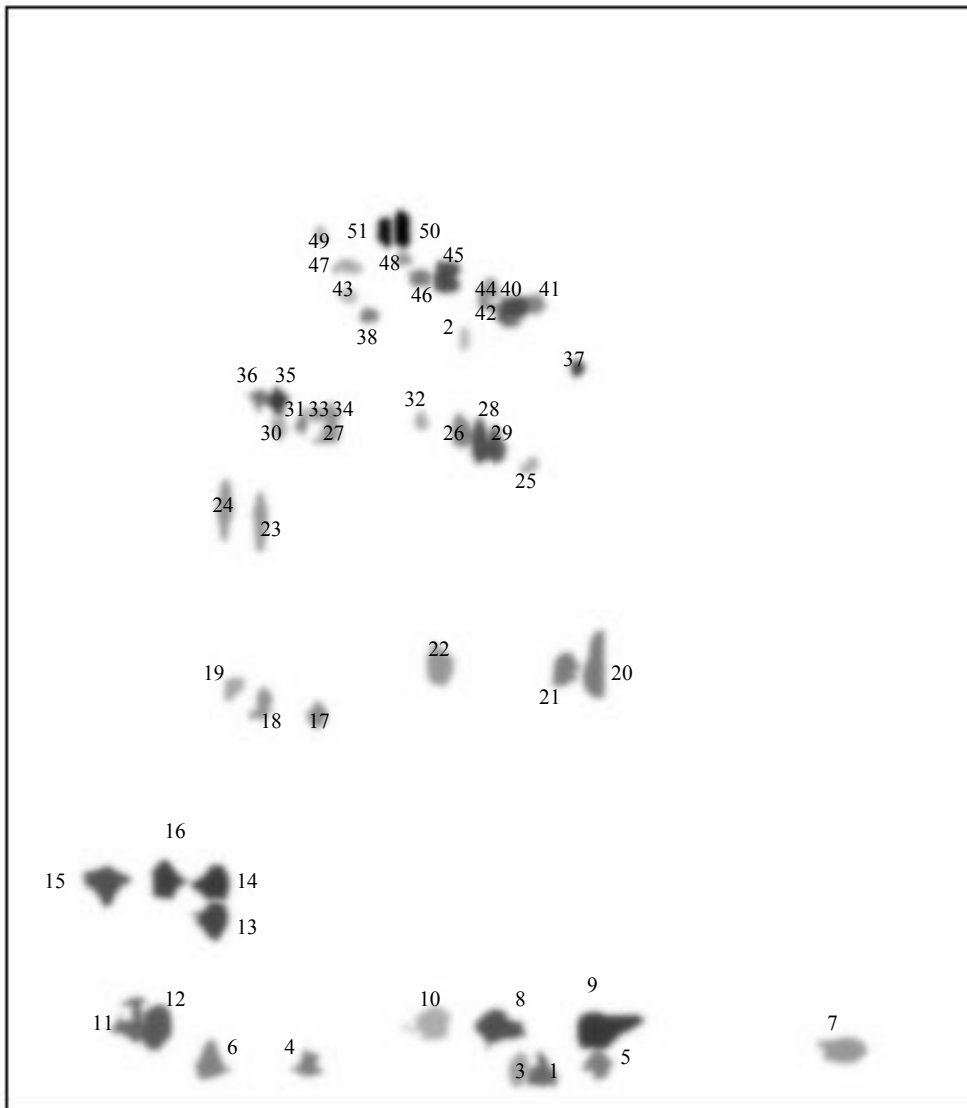


Figura 6: Gel sintetico controllo sano

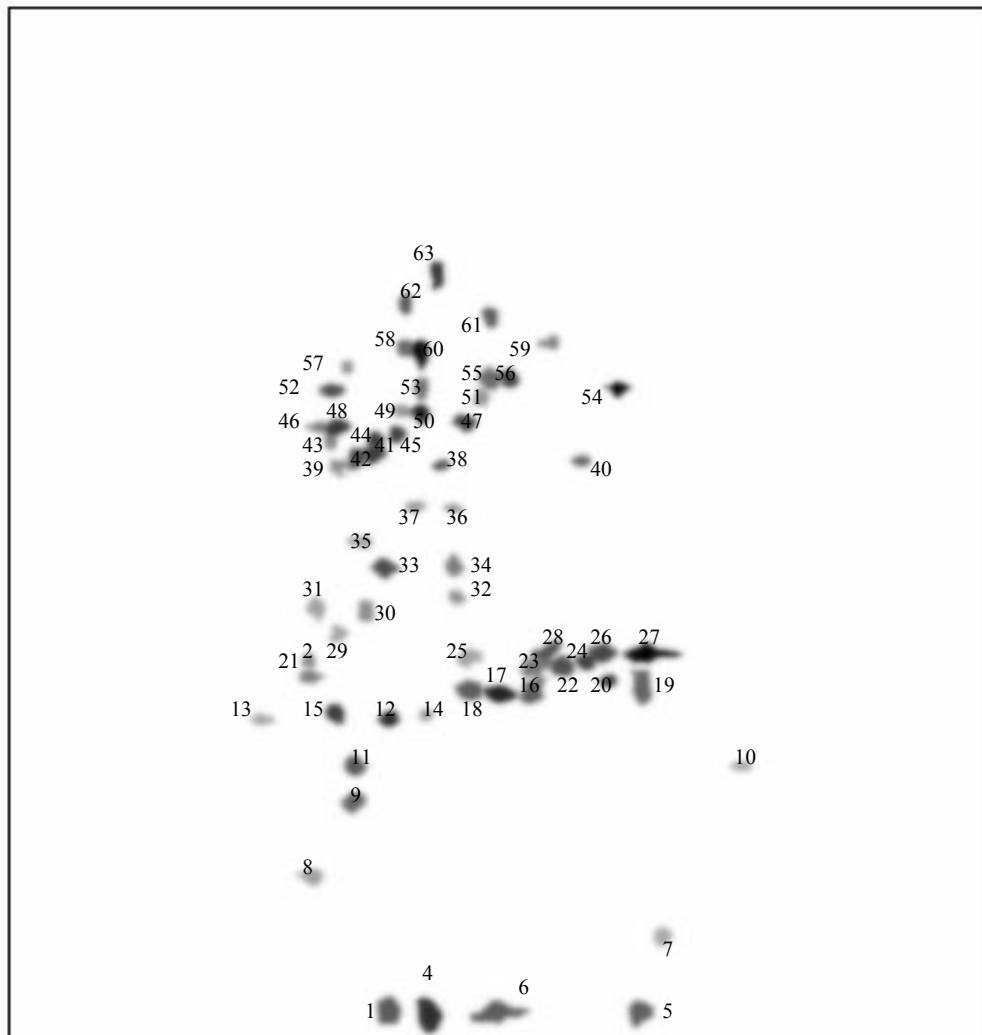


Fig 7: Gel sintetico Sindrome di Sjogren

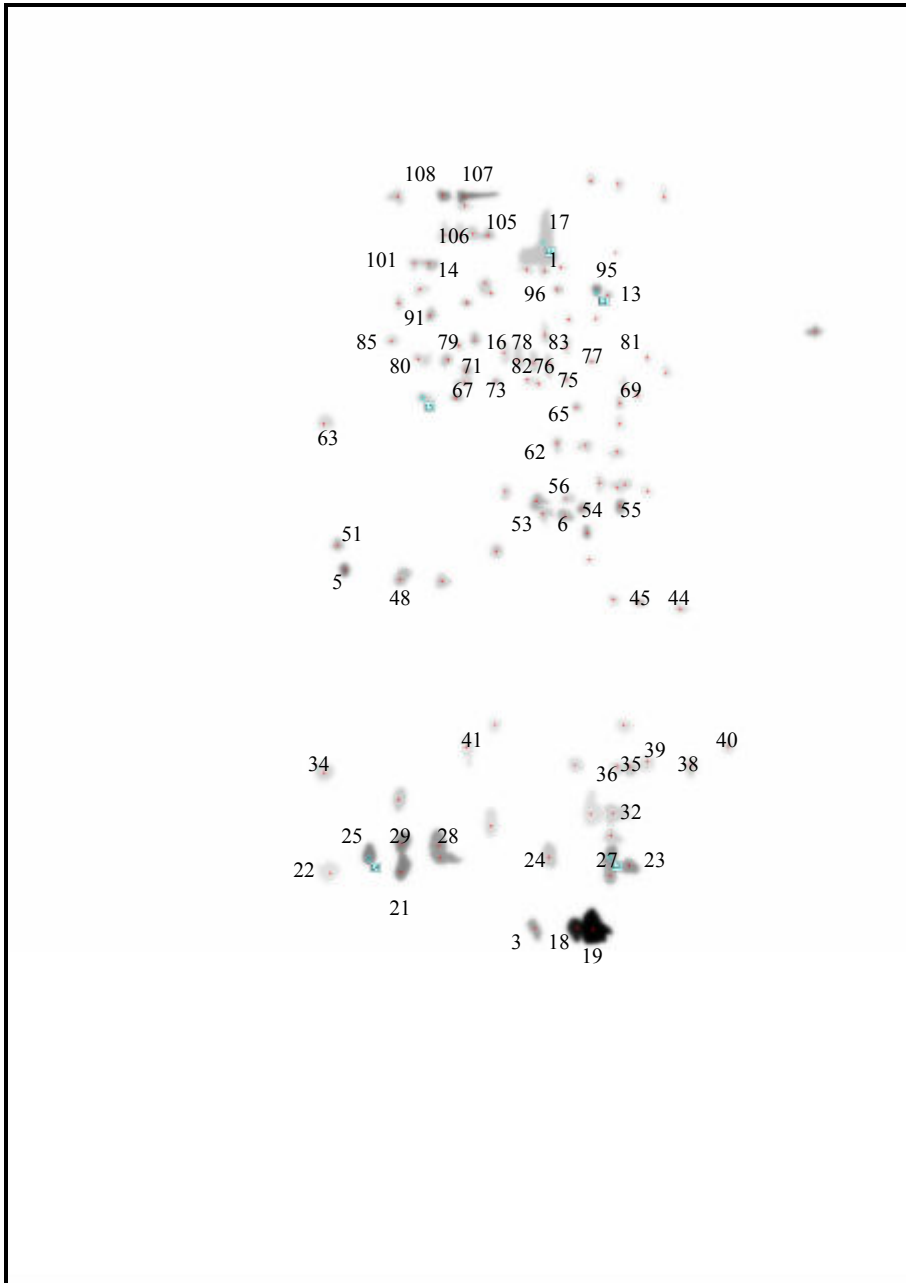


Fig 8: Gel sintetico Sindrome Sicca Idiopatica

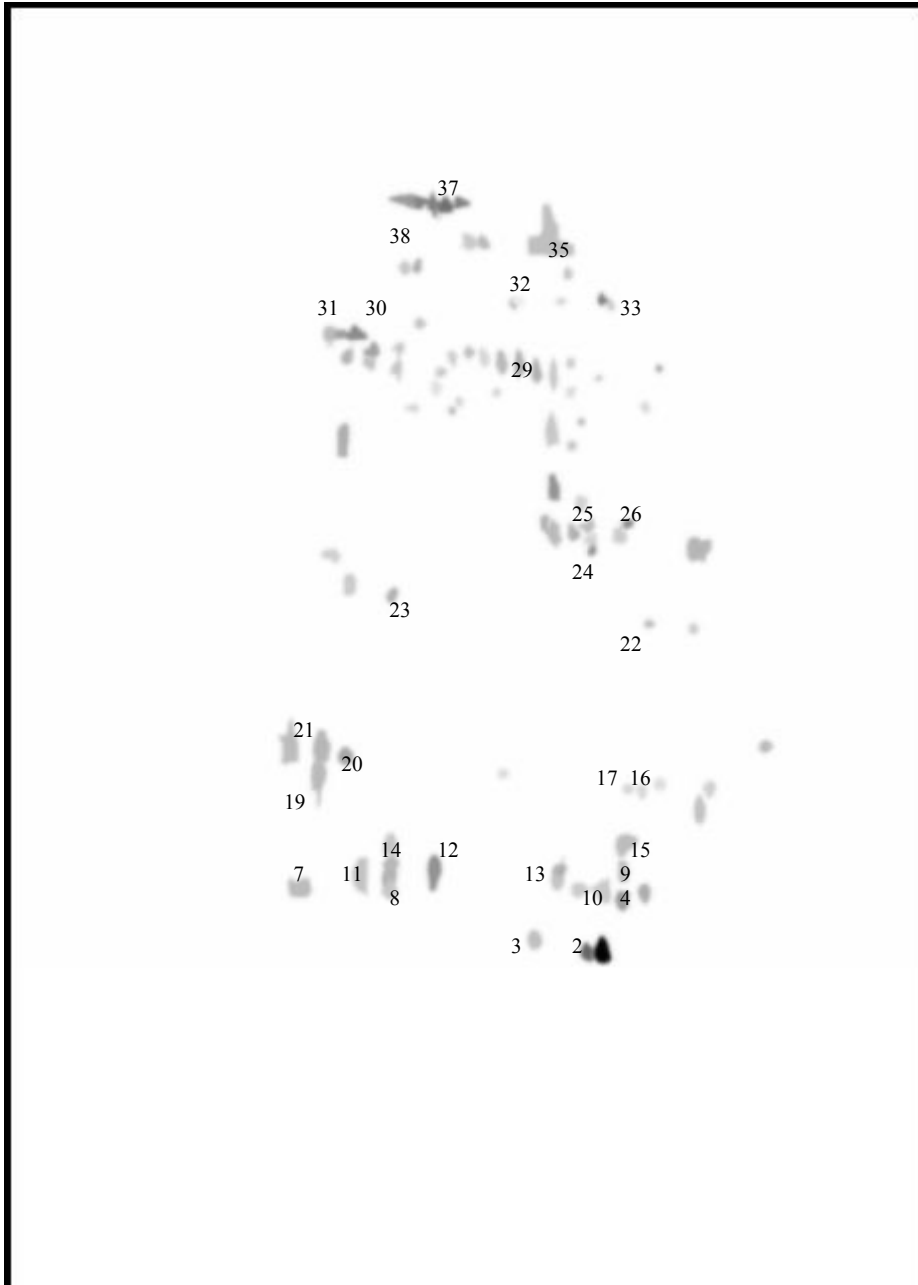


Fig 9: Gel sintetico pazienti con anticorpi anti-Ro/SSA

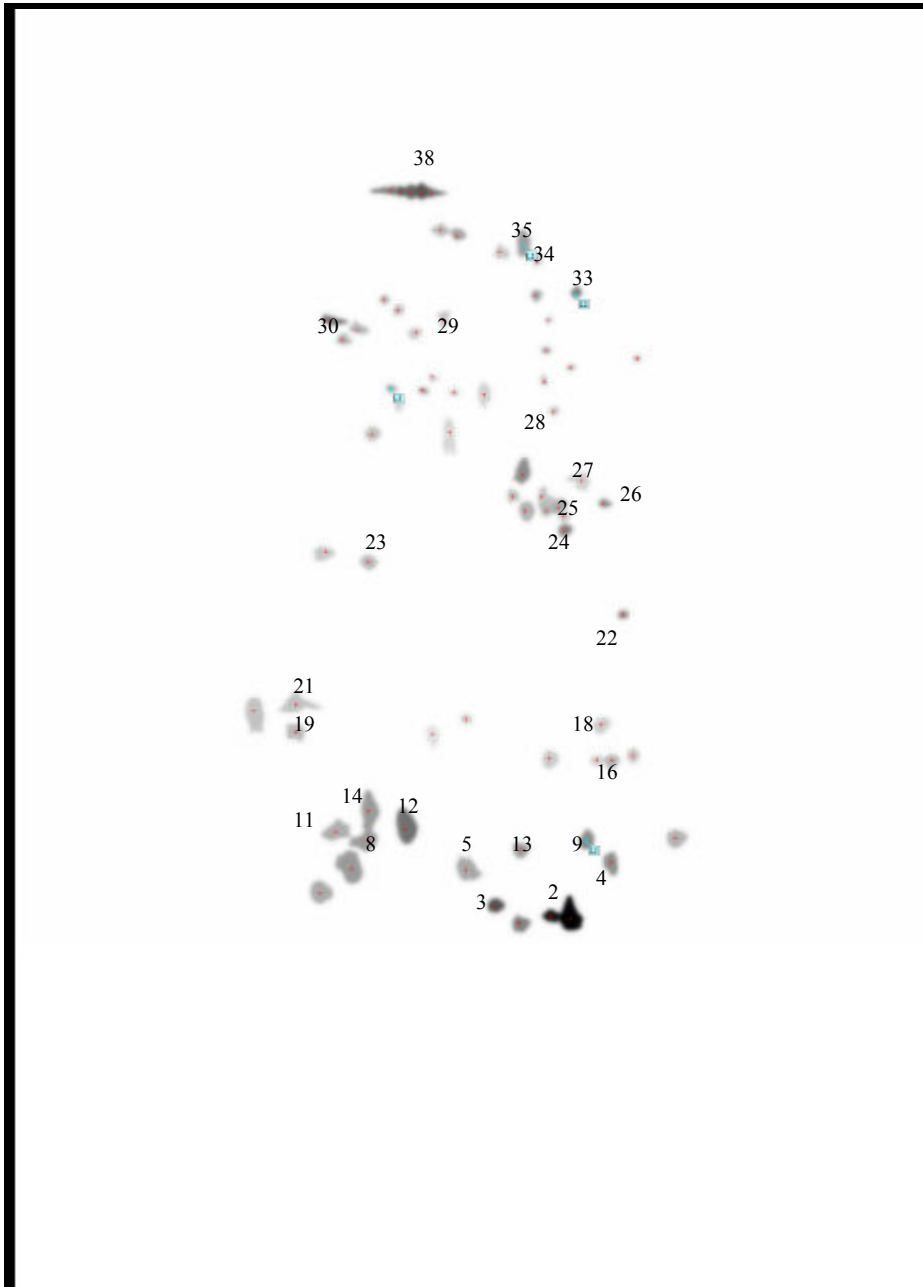


Fig 10: Gel sintetico pazienti con anticorpi anti- Ro/SSA e anti-La/SSB

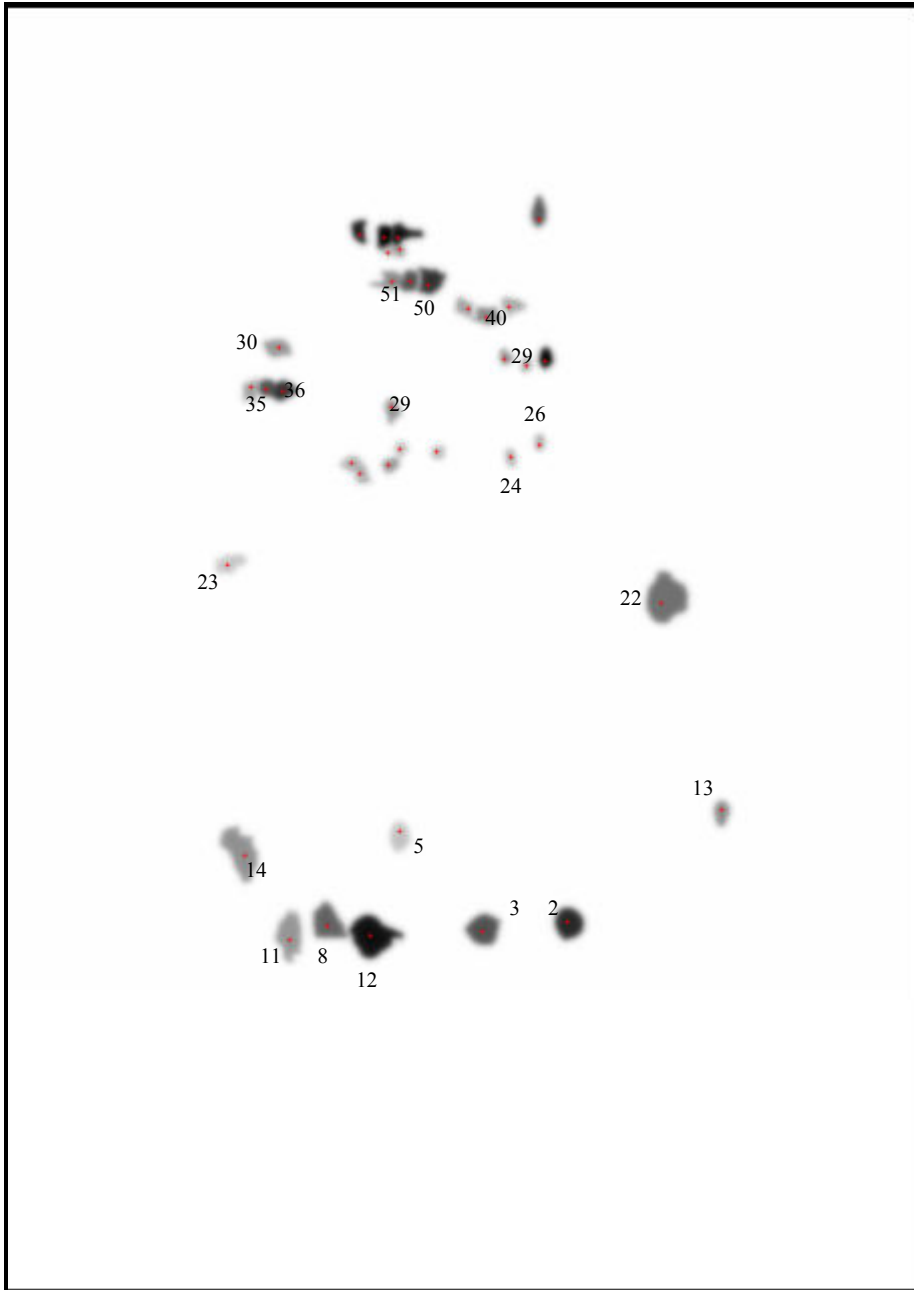


Fig 11. Gel sintetico Sclerosi Sistemica Progressiva

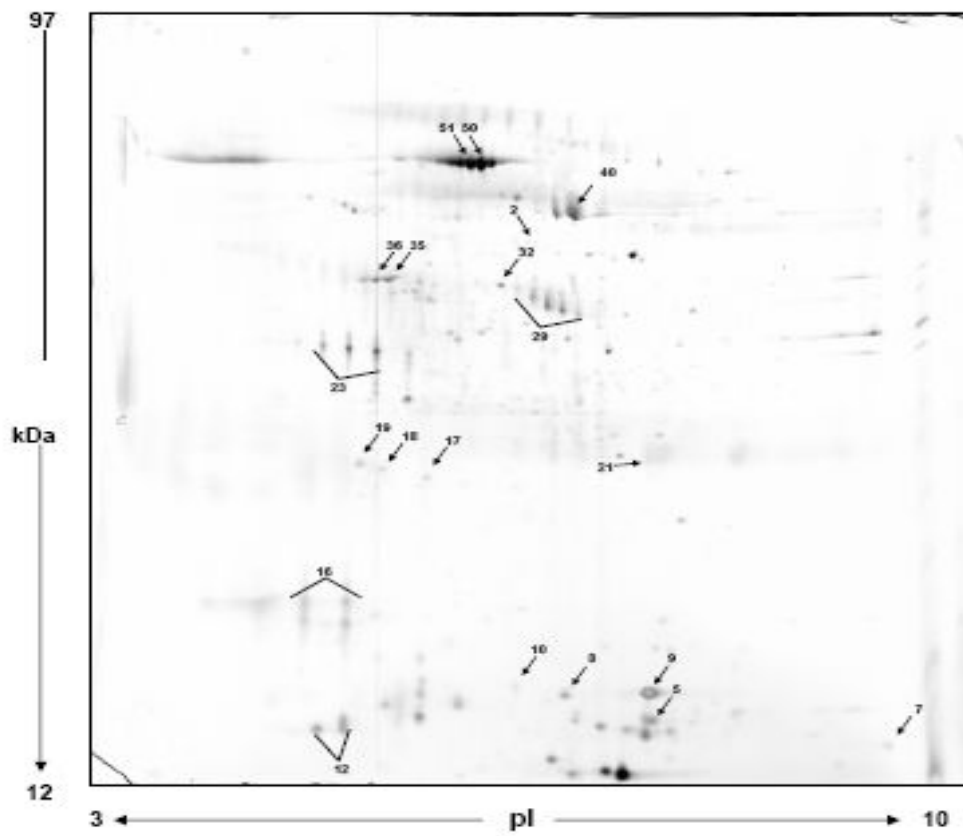


Fig 12: Gel rappresentativo controllo sano

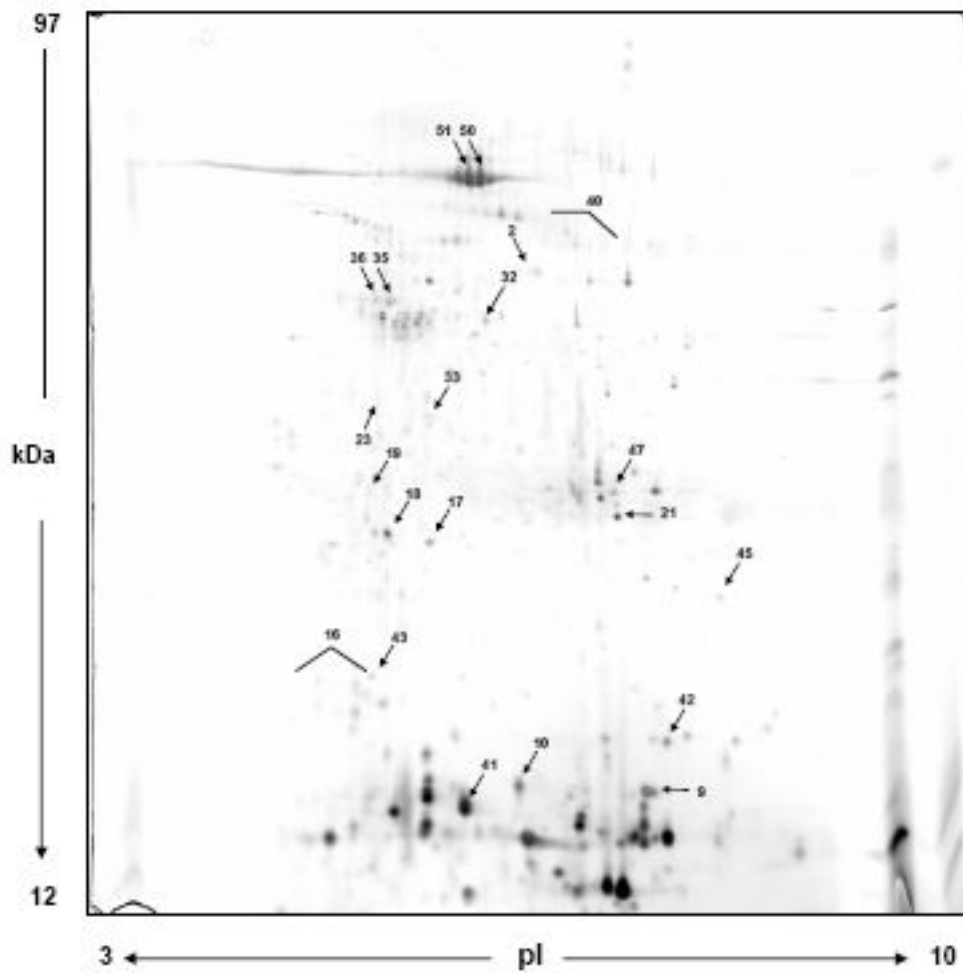


Fig 13: Gel rappresentativo Sindrome di Sjogren

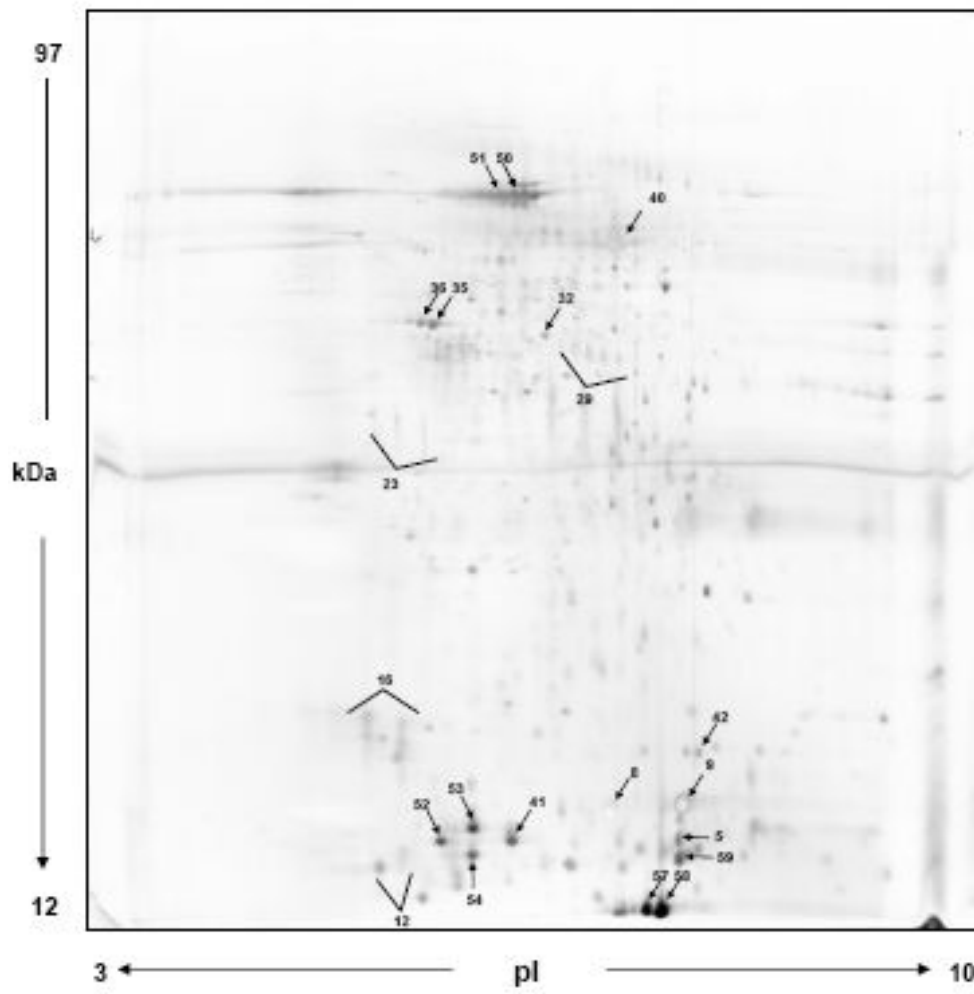


Fig 14: Gel rappresentativo Sindrome Sicca Idiopatica

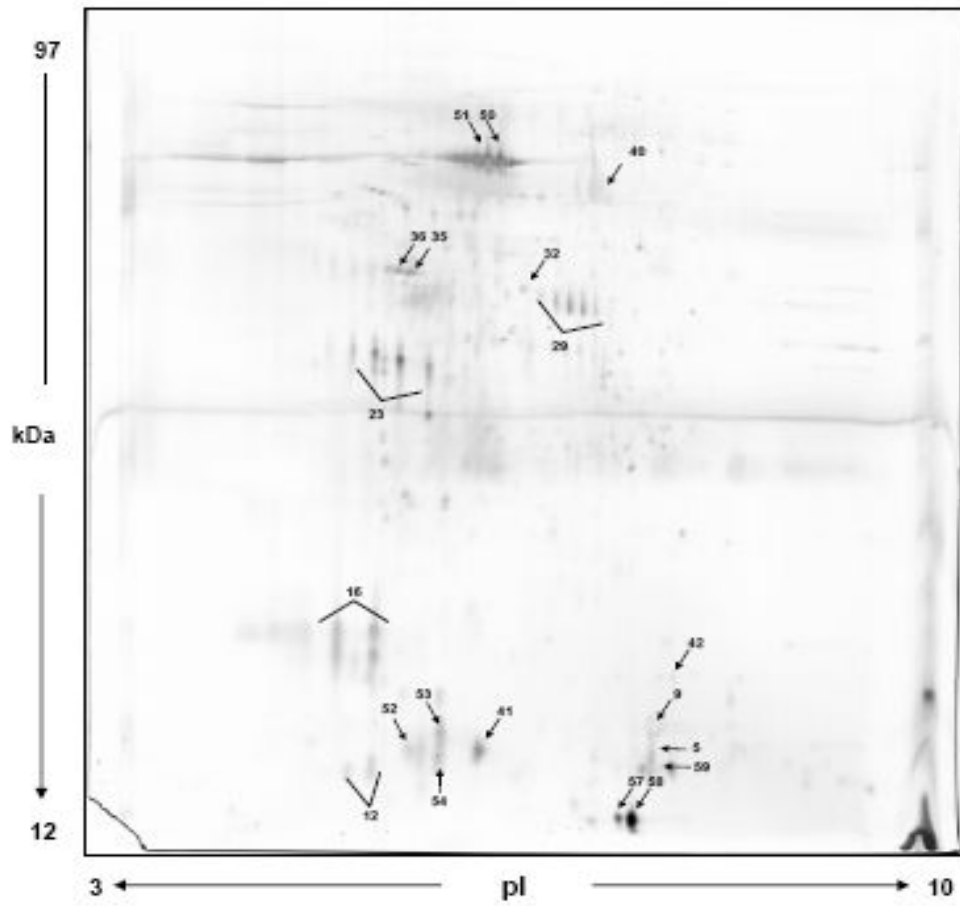


Fig 15: Gel rappresentativo dei pazienti con anticorpi anti-Ro/SSA

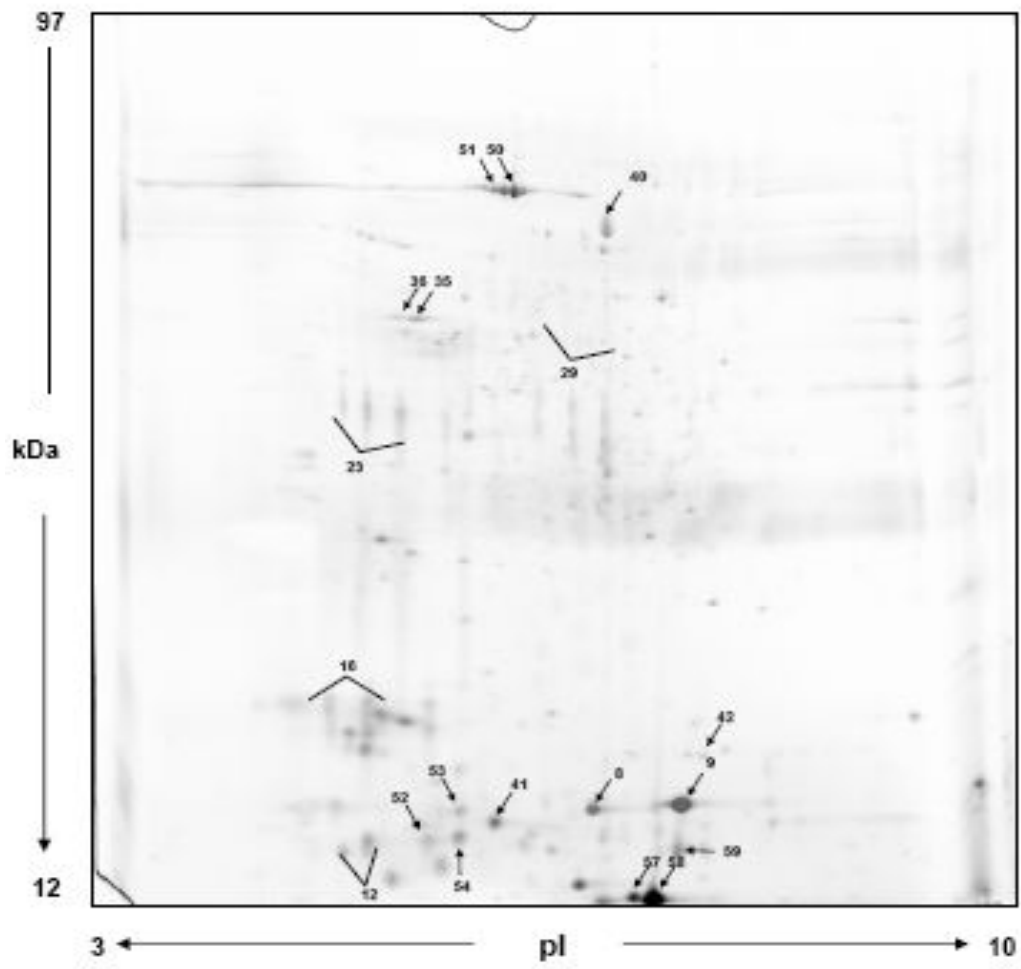


Fig 16: Gel rappresentativo pazienti con anticorpi anti-Ro/SSA e anti-La/SSB

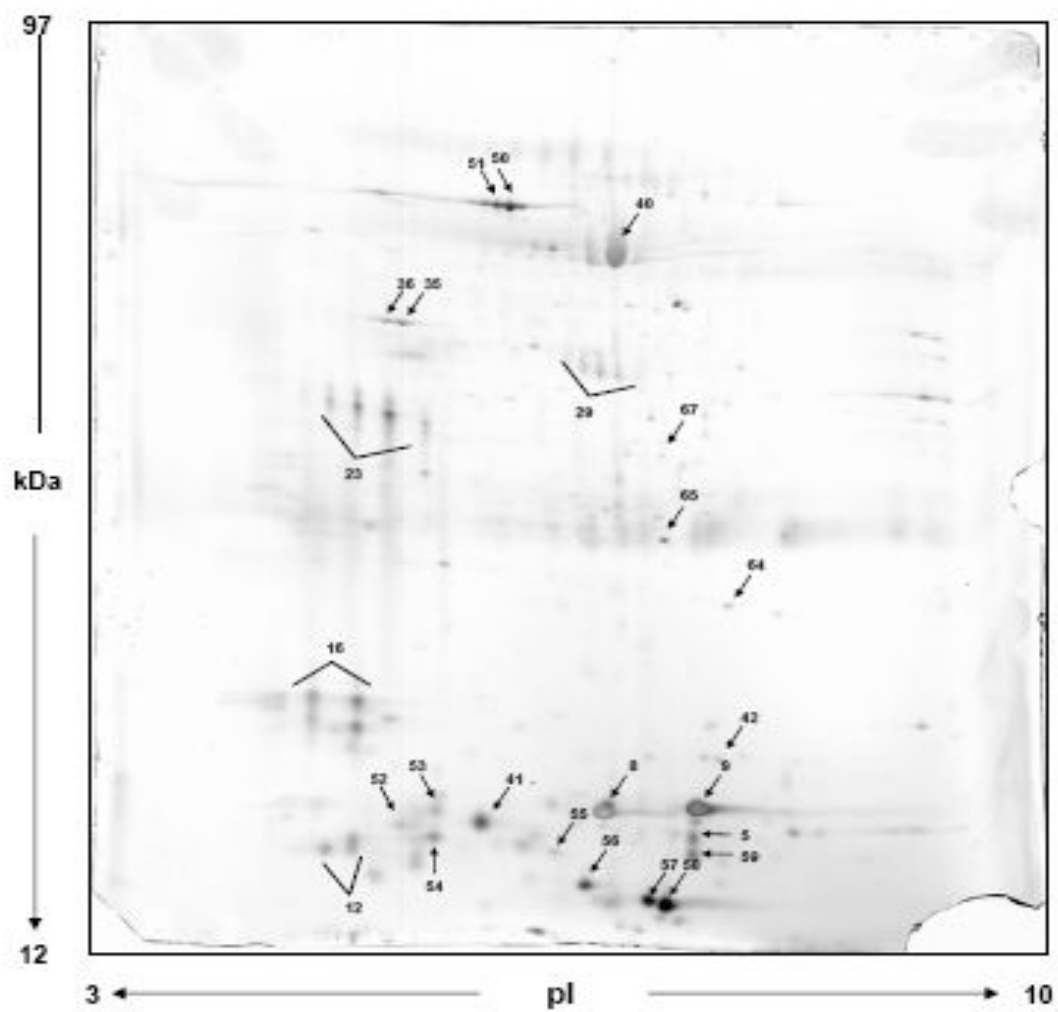


Fig 17: Gel rappresentativo Sclerosi Sistemica Progressiva



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PISA

Facoltà di Medicina e Chirurgia
Dottorato in Fisiopatologia Medica e Farmacologia
Anno Accademico 2005-2006

Tesi di dottorato:

**“Analisi proteomica della saliva
in pazienti affetti da Sindrome di Sjogren primitiva”**

Relatore: Prof. Stefano Bombardieri

Candidato: Chiara Baldini

INDICE:

| | |
|--|-------------------|
| RIASSUNTO | pag. 3-4 |
| I. INTRODUZIONE | |
| Ia. SjS: aspetti epidemiologici, eziopatogenetici, clinici e diagnostici | pag. 5-16 |
| Ib. SjS: modificazioni qualitative e quantitative nella composizione della saliva | pag. 17-18 |
| Ic. La proteomica | pag. 19-26 |
| Id. Applicazioni cliniche dell'analisi proteomica allo studio della saliva | pag. 27-29 |
| II. SCOPO DEL LAVORO | pag. 30-31 |
| III. MATERIALI E METODI | |
| IIIa. Pazienti | pag. 32-33 |
| IIIb. Materiali e strumentazione | pag. 34 |
| IIIc. Raccolta e preparazione del campione | pag. 34-36 |
| IIId. Elettroforesi bidimensionale | pag. 36-42 |
| IIIe. MALDI-TOF | pag. 42-43 |
| IIIf. Analisi statistica | pag. 43 |
| IV RISULTATI | |
| IVa. Analisi dei gel sintetici | pag. 44-50 |
| IVb. Analisi quantitativa delle proteine di interesse | pag. 50-53 |
| V. DISCUSSIONE | pag. 54-57 |
| VI. CONCLUSIONI | pag. 58-59 |
| VII. BIBLIOGRAFIA | pag. 60-68 |
| ALLEGATI | pag. 69-80 |

RIASSUNTO

La Sindrome di Sjogren primitiva (SjS) è una malattia autoimmune sistemica a patogenesi multifattoriale che colpisce in maniera peculiare le ghiandole esocrine salivari e lacrimali. La flogosi cellulo-mediata determina una progressiva compromissione della funzione ghiandolare che si traduce, dal punto di vista clinico, in una tipica sindrome secca caratterizzata da secchezza orale e oculare persistenti.

Scopo del lavoro: considerando la peculiarità della SjS nel coinvolgimento diretto delle ghiandole salivari maggiori e minori, l'ipotesi di lavoro che ha guidato questo studio è stata quella di verificare se il fluido salivare dei pazienti potesse rispecchiare, nella composizione proteica, le alterazioni anatomico-funzionali determinate dalla malattia a livello del tessuto ghiandolare. Scopo del lavoro è stato, quindi, quello di caratterizzare mediante analisi proteomica il profilo proteico salivare di pazienti affetti da SjS e comparare il pattern ottenuto con quello di controlli sani e di un gruppo di controlli "patologici" al fine di identificare eventuali biomarkers di malattia.

Pazienti e metodi: Sono stati arruolati nello studio: 15 pazienti con diagnosi di SjS, formulata in accordo con i Criteri Internazionali validati per la diagnosi di malattia, 15 controlli sani e 30 "controlli patologici" comparabili per sesso ed età. Nell'ambito dei 30 controlli patologici: 15 soggetti risultavano affetti da Sclerodermia sistemica progressiva (malattia autoimmune sistemica in grado di determinare un impegno fibrotico non flogistico delle ghiandole salivari), 6 presentavano una Sindrome Sicca Idiopatica non immunomediata e, 9 soggetti risultavano asintomatici per quanto relativo alla secchezza delle mucose ma erano portatori di autoanticorpi patologici (anti Ro/SSA e anti La/SSB), altamente specifici per la SjS. La caratterizzazione del profilo proteico salivare è stata effettuata combinando l'elettroforesi bidimensionale con la spettrometria di massa (MALDI-TOF mass spectrometry). I campioni sono stati raccolti in condizioni standard, centrifugati a 14000 g per 20 minuti a 4°C per rimuovere materiale insolubile e cellule, opportunamente preparati, e sottoposti ad elettroforesi bidimensionale. La prima dimensione è stata effettuata su strip di 18 cm in cui è presente un gradiente lineare di pH 3-10. La seconda dimensione è stata effettuata su gel di poliacrilammide 12% (20cm×20cm×1,5mm). I gel analitici sono stati colorati mediante Silver staining, mentre i gel preparativi per la spettrometria di massa con il Blu Coomassie Colloidale. Le immagini dei gel sono state acquisite tramite uno scanner (Epson Expression 1680) e analizzate con il programma Image Master 2D Platinum 5.0 dell'Amersham Bioscience. Gli spot di interesse sono stati, infine, identificati mediante MALDI-TOF mass spectrometry.

L'analisi statistica è stata condotta mediante test ANOVA per il confronto delle medie tra più gruppi analizzati simultaneamente e mediante *t*-test per il confronto delle medie dei gruppi a due a due. Un p-value <0.05 è stato considerato statisticamente significativo.

Risultati: Lo studio ha permesso mettere in evidenza numerose differenze tra il pattern proteico salivare dei pazienti con SjS ed i profili proteici salivari dei soggetti sani e dei controlli patologici. In particolare, nei pazienti con SjS è stato possibile osservare una riduzione nei livelli di espressione di alcune tipiche proteine salivari acinari (albumina, α -amilasi salivare, PIP, cheratina 6L, anidrasi carbonicaVI), un'alterata espressione di proteine coinvolte nell'equilibrio proteasi / antiproteasi con una riduzione delle cistatine e dei loro precursori e un incremento dell'inibitore dell'elastasi leucocitaria, un incremento di proteine coinvolte nel danno tissutale (actina, lipocalina-1 precursore) e, infine, un'aumentata espressione di proteine infiammatorie e legate all'autoimmunità (calgranulina B, ciclofillina A, catena leggera κ delle immunoglobuline, beta2-microglobulina).

Conclusioni: Lo studio, seppure preliminare, ha permesso di documentare come il pattern proteico salivare dei pazienti con SjS risulti profondamente alterato e presenti aspetti peculiari che, in parte riflettono l'impegno flogistico selettivo da parte della malattia delle ghiandole salivari, in parte riflettono le alterazioni dell'ambiente orale che essa induce e, in parte, infine, la natura autoimmune sistemica della SjS. L'insieme delle alterazioni osservate suggerisce che il dosaggio dei livelli salivari di un numero limitato di proteine, identificate tramite analisi proteomica, possa costituire un valido ausilio nella diagnosi di malattia, configurando una sorta di algoritmo proteico da applicare soprattutto nei casi che rimangono dubbi nelle indagini di diagnostica tradizionale. Complessivamente, quindi, seppure a livello preliminare, lo studio ha mostrato come l'analisi proteomica di fluidi biologici scarsamente complessi e facilmente reperibili come la saliva possa rappresentare un'ulteriore ausilio nella diagnosi delle malattie reumatiche, in generale, e della SjS in particolare.

I.INTRODUZIONE

Ia. Sindrome di Sjogren: aspetti epidemiologici, eziopatogenetici, clinici e diagnostici

La sindrome di Sjogren (SjS) è una malattia autoimmune sistemica che colpisce caratteristicamente le ghiandole esocrine ed in particolare le ghiandole salivari e quelle lacrimali manifestandosi, clinicamente, con una sindrome secca oculare e orale che deriva dal coinvolgimento anatomico e funzionale delle ghiandole stesse (1).

Dal punto di vista nosografico la malattia può presentarsi in forma isolata (SjS idiopatica o primitiva), oppure in associazione ad altre malattie autoimmuni come l'Artrite Reumatoide, il Lupus Eritematoso Sistemico o la Sclerodermia: si parla in tal caso di SjS secondaria (2).

La SjS primitiva ha una distribuzione ubiquitaria e colpisce preferenzialmente soggetti di sesso femminile (rapporto femmine: maschi = 9:1) con un primo picco di incidenza nella II-III decade di vita ed un secondo picco in età post-menopausale, nella V decade di vita. I dati relativi alla prevalenza e all'incidenza di malattia sono estremamente discordanti e sono condizionati dai criteri classificativi utilizzati nei diversi studi epidemiologici; in tal senso, il tasso di prevalenza della SjS è stimato in un range variabile tra lo 0.15% e il 3.3%, mentre il tasso di incidenza varia da 1: 1000 a 1: 100 a seconda dei diversi studi in esame (3-6). Le discrepanze degli studi epidemiologici condotti sulla malattia possono, almeno in parte essere giustificate dal fatto che criteri classificativi per la SjS primitiva e secondaria, accettati a livello internazionale, sono stati elaborati solo recentemente, nell'ambito dell' American-European Consensus Group nel 2002 (7) (Tabella 1). Utilizzando tali criteri la prevalenza della malattia è stimata pari a circa lo 0.5% nella popolazione adulta (8).

Tabella 1: *American European Consensus Criteria 2002*

| |
|---|
| 1. Sintomi oculari Una risposta positiva almeno ad una delle seguenti domande: Ha sensazione quotidiana di occhi secchi da oltre tre mesi? Ha sensazione di sabbia/corpo estraneo negli occhi? Utilizza lacrime artificiali per più di tre volte al giorno? |
| 2. Sintomi orali Una risposta positiva almeno ad una delle seguenti domande: Ha sensazione quotidiana di bocca secca da oltre tre mesi? Ha tumefazione ricorrente o persistente delle ghiandole salivari? Deve bere molto per inghiottire cibi secchi? |
| 3. Segni Oculari Schirmer test (<5 mm in 5 min) Rosa Bengala positivo |
| 4. Istopatologia Focus score > 1 (Focus: aggregato di almeno 50 cellule mononucleate adiacente ad acino intatto, Focus score numero di foci per 4 mmq) |
| 5. Impegno delle ghiandole salivari Scintigrafia salivare Scialografia parotidea Riduzione del flusso salivare (< 1,5 ml in 15 min) |
| 6. Autoanticorpi Ro-SSA e/o La-SSB |

Per SjS primario:

- Presenza di 4 criteri su sei positivi di cui almeno uno sia rappresentato dall'istopatologia o dalla sierologia
- Presenza di 3 dei 4 criteri "obiettivi" (punti 3 ,4 ,5 ,6)

Per SjS secondario: criteri 1 e 2 + almeno due tra 3, 4 e 5

Criteri di esclusione: radioterapia, HCV, AIDS, linfoma pre-esistente, sarcoidosi, GVHD, uso di farmaci anticolinergici

Dal punto di vista eziopatogenetico la SjS è descritta come un processo sequenziale “multistep” di tipo multifattoriale che sembrerebbe originare dall’interazione tra fattori di predisposizione genetica e agenti esogeni ambientali in grado di innescare risposte autoimmunitarie abnormi, sia da parte dei linfociti T che dei linfociti B, rivolte contro auto-antigeni tissutali; tali risposte sarebbero in grado di sostenere, perpetuare e amplificare il danno tissutale portando ad uno stato infiammatorio cronico e ad una progressiva perdita funzionale degli organi colpiti (2). I fattori di predisposizione genetica suggeriti sono essenzialmente rappresentati dai geni del sistema maggiore di istocompatibilità (HLA). La SjS è, infatti, strettamente associata all’espressione dell’HLA-DR3 e dei geni ad esso correlati B8 e DQ2. Tale associazione è particolarmente forte per i soggetti con SjS che producono anticorpi anti-Ro/SSA (9). Oltre al sistema HLA gli studi più recenti hanno focalizzato l’attenzione su geni polimorfici che codificano per molecole coinvolte fisiologicamente nella risposta immunitaria come il gene dell’IL-10 (aplotipo GCC), il gene del TNF alfa (allele TNF-308A) e il gene della catena alfa del recettore dell’IL4. Altri polimorfismi genici sono stati osservati a carico del gene della lectina legante il mannosio e dei recettori di alcune chemochine, in particolare del recettore CCR5 che lega le chemochine chemoattrattanti delle cellule mononucleari CCL3, CCL4 e CCL5 (10). Anche gli agenti ambientali legati alla patogenesi della SjS sono molteplici ma, in primis, sono chiamati in causa fattori ormonali (ruolo protettivo degli androgeni e pro-infiammatorio degli estrogeni che sembrerebbero contrastare l’apoptosi dei cloni linfocitari auto-reattivi) e numerosi agenti virali scialotropi come il virus di Epstein-Barr (EBV), il virus dell’epatite C (HCV) ed il retrovirus-I della leucemia umana a cellule T (HTLV-I) (10). Negli ultimi anni, il gruppo di Moutsopoulos ha identificato la presenza di RNA virale di Coxsackie virus nelle biopsie delle ghiandole salivari minori di pazienti con SjS e un’omologia di sequenza dell’87% tra un peptide derivato dalla proteina 2B dei Coxsackievirus e la regione 222-229 dell’epitopo lineare maggiore dell’auto-antigene Ro60KD, che è considerato uno degli auto-antigeni più specifici della SjS (11).

Alla luce delle più recenti acquisizioni, anche se l’eziologia della SjS rimane ancora in larga parte sconosciuta, sono stati elaborati diversi modelli patogenetici in grado di spiegare il ruolo dei diversi elementi cellulari nel danno ghiandolare che si verifica in corso di malattia. Il modello patogenetico più largamente condiviso è quello dell’“epitelite autoimmune” secondo il quale le cellule epiteliali rivestirebbero un ruolo cruciale nella formazione degli aggregati linfocitari periduttali (12). La SjS presenta, infatti, un quadro istopatologico caratterizzato da infiltrati linfocitari focali che interessano generalmente la

regione periduttale delle ghiandole esocrine ma che potenzialmente possono colpire qualunque organo e apparato (es. epitelio tubulare renale, epitelio bronchiale, epitelio dei colangioli epatici etc). Tali aggregati originano essenzialmente dalle interazioni tra le cellule epiteliali e le cellule immuni T e B. Gli aggregati linfocitari sono costituiti essenzialmente da linfociti CD4⁺ positivi che presentano essenzialmente un fenotipo memoria (CD45 RO⁺), esprimono il recettore TCR α/β e sono in grado di secernere INF- γ e IL-10. In percentuale minore sono stati evidenziati anche linfociti T CD8⁺ positivi che esprimono l'integrina (CD 103) e che si localizzano in prossimità di cellule epiteliali acinari E-caderina positive. Il rapporto CD4/CD8 a livello degli infiltrati è di 3:1-5:1. I linfociti B costituiscono solo il 20% degli infiltrati, e ancora più rari sono le cellule natural killer ed i macrofagi (complessivamente < 5%). Accanto agli infiltrati T linfocitari è possibile osservare frequentemente anche delle strutture ectopiche che sono analoghe ai centri germinativi e sono costituite essenzialmente da linfociti B, con una piccola percentuale di linfociti T e di cellule follicolari dendritiche. I linfociti B sono organizzati in una 'dark zone' centrale in attiva proliferazione (centroblasti) e in una zona più periferica 'light zone' di centrociti che vanno incontro a processi di selezione per l'espressione in superficie di anticorpi ad alta affinità. La presenza di questi centri germinativi ectopici è stata associata ad una più elevata positività di autoanticorpi anti Ro/SSA ed anti La/SSB, nonché ad un più alto rischio di trasformazione in senso linfoproliferativo (10). Secondo il "modello epitelitico" le cellule epiteliali, una volta attaccate da un ipotetico agente esogeno, si attiverebbero e inizierebbero a secernere elevate quantità di citochine pro-infiammatorie ed ad esprimere alti livelli di HLA DR richiamando in situ le cellule linfocitarie. Le cellule dell'epitelio ghiandolare fungerebbero da cellule presentanti l'antigene (APC) attivando i linfociti che potrebbero, a loro volta, interagire con i linfociti B innescando la risposta autoimmune (12). Un secondo modello proposto per la formazione degli aggregati è quello di una *disregolazione sistemica dei linfociti T circolanti*, ed in particolare dei linfociti Th1 positivi, che migrerebbero attivamente nelle ghiandole esocrine con un processo di homing mediato dall'adesione alle venule ad endotelio alto (HEV) fin dalle prime fasi di malattia. I linfociti Th1, attraverso la liberazione di citochine proinfiammatorie, ed in particolare di INF- γ , attiverebbero essi stessi le cellule epiteliali e le indurrebbero ad esprimere potenti chemoattrattanti in grado di richiamare altri linfociti e di amplificare il processo infiltrativo (13). I chemoattrattanti implicati sarebbero le chemochine, proteine a basso peso molecolare in grado di reclutare e attivare specifiche sottopopolazioni leucocitarie, modificando l'espressione e lo stato di

affinità delle molecole di adesione sulla superficie leucocitaria. Sulla scia di questa ipotesi, studi recenti hanno focalizzato l'attenzione, in particolare, su alcune chemochine INF- γ -indotte come la CXCL10 e la CXCL9, il cui mRNA è risultato up-regolato a livello delle cellule epiteliali dei dotti salivari dei pazienti con SjS rispetto ai controlli. Tali chemochine sarebbero in grado, a loro volta, di amplificare il processo richiamando ulteriori linfociti T CD3+ (14). Chemochine diverse come la CXCL13, chemoattrattanti verso i linfociti B, e il BAFF, citochina della superfamiglia del TNF, sarebbero, invece, coinvolte nella formazione delle strutture ectopiche simil germinative il cui ruolo nella successiva potenziale trasformazione linfomatosi rimane da chiarire (15). Recentemente, è stato ipotizzato, inoltre, che il ruolo dei linfociti B possa essere ancora più complesso dal momento che essi stessi sarebbero in grado di polarizzarsi, fungere da APC e produrre INF- γ , influenzando la differenziazione dei T-helper in senso T-helper 1. Questi dati porterebbero l'attenzione sui linfociti B come primi orchestratori del processo infiammatorio a carico delle ghiandole salivari (16). Comunque abbiano origine gli infiltrati linfocitari, una volta formati, essi comportano una progressiva distruzione dell'epitelio ghiandolare. Il principale meccanismo di distruzione dell'epitelio ghiandolare è rappresentato dalla morte cellulare programmata o apoptosi mediata dal sistema Fas/FasL e dal rilascio di perforina e granzima A (17). Anche se è ancora da chiarire se lo stimolo iniziale per il processo apoptotico sia intrinseco alle cellule epiteliali o sia mediato dai linfociti T, la formazione di blebs di membrana durante l'apoptosi porterebbe alla traslocazione a livello di membrana di componenti auto-antigeniche intracellulari che in questo modo guadagnerebbero l'ambiente extracellulare e potrebbero evocare la risposta auto-anticorpale. Un altro ulteriore meccanismo di esposizione di auto-antigeni endocitari sarebbe la liberazione di esosomi da parte delle cellule epiteliali ovvero di vescicole di membrana risultanti dalla fusione di endosomi e lisosomi. Tale meccanismo è stato osservato in vitro ma non ancora in vivo (2). I meccanismi patogenetici descritti giustificano, in realtà, una distruzione del 50-60% delle strutture acinari con una riserva funzionale residua del 40% (18). L'entità della compromissione della funzione secretoria è molto superiore nella SS rispetto al danno organico, e ciò ha portato ad ipotizzare che altri meccanismi siano coinvolti nella patogenesi della malattia (18). A livello del tessuto ghiandolare residuo, in particolare, alcuni autori hanno ipotizzato una disregolazione del trasporto dei fluidi, sottolineando in particolare una anomala distribuzione dei canali numero 5 dell'acquaporina nelle ghiandole salivari. Nel tessuto ghiandolare dei soggetti con SjS i canali dell'acquaporina, che regolano i movimenti dell'acqua attraverso le

membrane biologiche, sarebbero espressi non solo a livello apicale luminale ma anche a livello basolaterale determinando un ristagno interstiziale dei fluidi e contribuendo al deficit secretivo. Tale anomala distribuzione sarebbe mediata dal TNF- α e da altre citochine pro-infiammatorie prodotte localmente (19). In letteratura sono presenti dati contrastanti in questo senso; secondo altri autori, infatti, la distribuzione e la densità dell'acquaporina 5 nelle ghiandole salivari non differirebbe nei pazienti con SS rispetto ai controlli sani (20). Altri autori, negli ultimi anni, hanno indagato possibili alterazioni del circuito neurosecretorio che regola il funzionamento delle ghiandole esocrine (21). Sul parenchima ghiandolare sono presenti recettori transmembrana di tipo muscarinico, in particolare gli M3, che legano l'acetilcolina e che regolano il trasporto di ioni e di acqua attraverso le membrane cellulari nei dotti ghiandolari. Il numero dei recettori M3 eccede quello delle sinapsi neuronali ed in questo modo l'acetilcolina rilasciata da una terminazione nervosa può stimolare più acini adiacenti a quello direttamente innervato. Le alterazioni funzionali a carico del circuito neurosecretivo riguardano essenzialmente il braccio efferente del circuito, mentre quello afferente rimane integro considerando che il paziente avverte i sintomi legati alla secchezza orale e oculare. Uno dei meccanismi potenzialmente responsabili dell'iposecrezione potrebbe essere rappresentato da un ridotto rilascio di neurotrasmettitori (Ach) a livello delle giunzioni sinaptiche e/o da un'alterata risposta ai neurotrasmettitori a livello post-sinaptico. Durante il processo infiammatorio, citochine pro-infiammatorie come l'IL-1, il TNF-alfa o l'IL-6, possono interferire con il rilascio di acetilcolina da parte delle terminazioni colinergiche, inibendolo. Anche la produzione di secondi messaggeri a livello post-sinaptico è, allo stesso modo, fortemente condizionata in senso negativo dalla presenza di tali citochine, e di conseguenza le cellule ghiandolari appaiono meno responsive ai segnali efferenti (18). Infine, studi recenti hanno evidenziato un terzo meccanismo di alterazione del circuito neurosecretivo legato alla presenza di elevati livelli di anticorpi anti-M3R nei pazienti con SjS in grado di fungere da antagonisti muscarinici e di inibire la contrazione della muscolatura liscia (21). Il blocco del M3R potrebbe interferire con la secrezione ghiandolare anche contribuendo alla traslocazione dei canali dell'acquaporina (20). In conclusione la patogenesi della sindrome di Sjogren rimane ancora in larga parte da chiarire potendo essere legata sia ad un danno organico che ad un danno funzionale dei diversi parenchimi ghiandolari.

A fronte di tale complessità patogenetica il quadro clinico della sindrome di Sjogren è relativamente uniforme, essendo dominato dai sintomi legati alla secchezza delle mucose orale e oculare. Il coinvolgimento degli altri organi e apparati, seppure potenziale, si

manifesta in una minoranza dei pazienti, solitamente nelle fasi più tardive di malattia e con un'intensità clinica generalmente di tipo lieve-moderato (22). La sintomatologia oculare è caratterizzata da quadri di cheratocongiuntivite secca con ipolacrimazione, arrossamento della congiuntiva e sensazione persistente di corpo estraneo nell'occhio. Nei casi più gravi possono insorgere infezioni oculari ricorrenti e possono manifestarsi abrasioni della superficie corneale ed ulcere che possono comportare un deficit del visus (23). La sintomatologia orale è, invece, caratterizzata da una persistente xerostomia con difficoltà nella masticazione, nell'eloquio e necessità di assumere liquidi molto frequentemente. I pazienti possono riferire, inoltre, modificazioni del gusto (es. 'sensazione metallica in bocca', 'bocca amara'), tosse secca, disfagia, disagio nel portare protesi dentarie e, infine, nicturia con disturbi del ritmo sonno-veglia secondaria all'eccessiva assunzione di liquidi durante le ore diurne. Inoltre, a seconda delle casistiche, danni a carico dei processi di mineralizzazione dentaria ed alterazioni della flora microbica orale con aumento relativo dei batteri 'cariogeni' e delle diverse specie di *Candida* sono osservati fin nell'80% dei pazienti (24). All'esame obiettivo la mucosa orale appare eritematosa e asciutta e di solito si osserva la mancanza di saliva sul pavimento della bocca e/o la presenza di saliva particolarmente densa e viscosa in corrispondenza dello sbocco dei dotti delle ghiandole salivari maggiori. La superficie dorsale della lingua è spesso anch'essa arrossata e può presentare atrofia delle papille filiformi e fissurazioni laterali. In un terzo circa dei pazienti, infine, le ghiandole salivari maggiori possono presentare tumefazioni ricorrenti e bilaterali; la tumefazione delle parotidi è la più evidente ma spesso è preceduta da quella delle ghiandole sottomandibolari che, tuttavia, può essere misconosciuta (25). Nell'ambito delle manifestazioni sistemiche la malattia può potenzialmente colpire tutti gli organi e gli apparati. La tabella 2 riassume i principali quadri clinici descritti in letteratura e la loro prevalenza. La complicanza più temibile della malattia è tradizionalmente considerata l'insorgenza di una malattia linfoproliferativa e, in particolare, di un linfoma non Hodgkin a cellule B, che generalmente è un linfoma di basso grado della zona marginale. In realtà, ad oggi, studi trasversali hanno evidenziato come solo il 4% dei pazienti con SjS presenti tale complicanza ed il solo studio prospettico longitudinale che ne ha valutato l'incidenza, ha evidenziato come il 7% di pazienti con SjS abbia sviluppato tale affezione in un follow-up di cinque anni (26, 27). Tuttavia, analizzando le possibili cause di morte nei soggetti con SjS, non si evidenziano differenze statisticamente significative rispetto alla popolazione generale, se non per il rischio legato proprio alle complicanze linfoproliferative che sono responsabili di un eccesso di mortalità pari a 2.53 per 1000

persone-anno (8). Uno studio multicentrico europeo, condotto su 33 pazienti seguiti in 9 centri, ha, pertanto, recentemente cercato di mettere in evidenza le caratteristiche del subset di pazienti a rischio per linfoma, identificando nella presenza di linfadenopatia, vasculite cutanea, ipocomplementemia, coinvolgimento del sistema nervoso periferico, febbre, anemia e linfopenia potenziali fattori predittivi per una prognosi negativa (28). Fatta eccezione per le complicanze linfomatose, la SjS si presenta, invece, in conclusione, come una malattia a carattere relativamente favorevole e scarsamente aggressiva, anche se a decorso lentamente progressivo, nella quale la qualità di vita dei pazienti è condizionata essenzialmente dalla sintomatologia ghiandolare (29).

Tabella 2: Manifestazioni extraghiandolari e prevalenza

| Apparato/Organo | Quadri clinici | Prevalenza |
|------------------------|---|-------------------|
| Muscoloscheletrico | Artralgie | 60-70% |
| | Artrite | 10-20% |
| | Mialgie | 30-50% |
| Cardiovascolare | F. di Raynaud | 15%-35% |
| Respiratorio | Xerotrachea | 20%-25% |
| | Afezioni bronchiolari di tipo ostruttivo | 20%-33% |
| | Interstiziopatia polmonare (clinica e subclinica) | 8%-35% |
| Genito-urinario | Nefropatia tubulointerstiziale | 15%-20% |
| | Glomerulonefrite | 2%-5% |
| | Dispareunia | 10%-30% |
| Gastroenterico | Disfagia | 25-30% |
| | Epatopatia autoimmune | 5% |
| Cute | Vasculite cutanea | 10% |
| | Xerosi cutanea | 23%-68% |
| ORL | Ipoacusia | 27% |
| Ematologico | Anemia | 18% |
| | Leucopenia | 18% |
| | Linfopenia | 9% |
| SNP | Multinevrite sensitivo motoria | 2-10% |
| | Neuropatia autonoma | ? |
| Endocrino | Tireopatia | 30% |

Dal punto di vista dei dati di laboratorio, nella SjS, gli esami ematochimici routinari possono documentare un'ipergammaglobulinemia policlonale (80%) ed un rialzo della velocità di eritrosedimentazione in presenza di valori normali o solo modificamente alterati della proteina C reattiva (10). La SjS è caratterizzata anche da un ampio spettro di autoanticorpi non organo specifici che comprendono: anticorpi antinucleari (80%), fattore reumatoide (60-90%), anticorpi anti-Ro/SSA (60-80%) e anti-La/SSB (40-60%). La positività del fattore reumatoide si riscontra in media nel 60% dei soggetti ma una caratteristica peculiare della SjS è che, mentre nel siero è presente il fattore reumatoide di

classe IgM, nella saliva, invece, è evidenziabile un fattore reumatoide di tipo IgA, probabilmente prodotto localmente a livello ghiandolare (10). Gli anticorpi anti-Ro/SSA e anti-La/SSB sono considerati i più specifici per la SjS e fanno parte dei criteri classificativi per la malattia (7). Inoltre, gli anti-Ro/SSA sembrano correlare con l'impegno cutaneo vasculitico mentre gli anti-La/SSB con la tumefazione parotidea ed in genere con l'impegno extraghiandolare sistemico (30, 31). I bersagli antigenici degli anticorpi anti-Ro/SSA e anti-La/SSB sono costituiti da complessi ribonucleoproteici, fisiologicamente localizzati a livello citoplasmatico (70%) o intranucleare (30%). Sono descritte due proteine diverse di tipo Ro: una di 52 kDa e una di 60 kDa, mentre è nota una sola proteina di tipo La di 48 kDa. Il complesso ribonucleoproteico è costituito da RNA a basso peso molecolare (28 - 38 kDa) cui si possono fissare direttamente la proteina Ro 60 kDa (all'estremità 5') o la proteina La 48kDa (all'estremità 3'). La proteina Ro 52 kDa si fissa indirettamente all'RNA utilizzando come intermediario la Ro 60 kDa. La funzione delle molecole Ro e La rimane ancora in larga parte sconosciuta. La proteina La/SSB parteciperebbe ai fenomeni di trascrizione del DNA e nella fattispecie al complesso dell'elicasi ATP dipendente per la formazione dell'ibrido RNA/DNA; inoltre essa interverrebbe nella maturazione e nell'esportazione nel citoplasma dei trascritti dell'RNA polimerasi III. La Ro/SSA favorirebbe invece il trasporto dell'RNA dal nucleo al citoplasma. Nel nucleo la Ro 52 è fissata ad alcuni motivi del DNA e fungerebbe da regolatrice dell'espressione genica; la Ro 60, invece, inibirebbe la trascrizione operata dall'RNA polimerasi III (32). Nell'ambito dell'ampio spettro di autoanticorpi descritti un ruolo ancora controverso sembra essere svolto dagli anticorpi anti- α -fodrina. L' α -fodrina è una proteina di 240kDa che appartiene al citoscheletro cellulare e che è stata identificata in tutte le cellule, incluse quelle dei tessuti ghiandolari. Anticorpi anti- α -fodrina di classe IgG o IgA sono stati evidenziati sia nei modelli murini di SjS che nei pazienti con SjS in percentuali variabili tra il 52% e il 93%. Ad oggi, il significato clinico di questi autoanticorpi rimane ancora da chiarire anche se, poichè l' α -fodrina è associata con pompe e canali ionici di membrana, è stato ipotizzato che gli autoanticorpi anti- α -fodrina possano interferire con il funzionamento delle suddette pompe e quindi con la funzione secretoria delle ghiandole (33).

La diagnosi di SjS si basa sulla combinazione di elementi clinici, sierologici, strumentali e istologici. L'iter diagnostico prevede che la sintomatologia soggettiva del paziente relativa alla secchezza degli occhi e della bocca venga registrata mediante questionario validato

(34). Per l'obiettivazione di tale sintomatologia sono utilizzati test oculari per lo studio del film lacrimale (Test di Schirmer e Rosa Bengala) e test di valutazione morfologica e funzionale delle ghiandole salivari maggiori, quali la scialometria, la scialografia e la scintigrafia salivare. In particolare, il test di Schirmer consente di misurare la secrezione lacrimale utilizzando strisce di carta bibula poste nel fornice congiuntivale inferiore per 5 minuti. Il test è positivo se dopo 5' sono bagnati < di 5 mm della striscia di carta bibula. Il Rosa Bengala, oggi sostituito dal verde di lissamina, è, invece, un colorante specifico per cellule devitalizzate e mucina che, in presenza di un danno dell'epitelio congiuntivale o corneale, si fissa sulle cellule rendendo visibili le lesioni epiteliali (23). Dei test di valutazione delle ghiandole salivari maggiori, la scialometria consente di misurare il flusso salivare (patologico se < a 1,5 min /15 minuti), la scialografia di osservare l'architettura e la configurazione del sistema duttale e, infine, la scintigrafia permette una valutazione funzionale delle ghiandole salivari attraverso la velocità di captazione del pertecnato di sodio marcato con Tc 99m (25). Un ausilio per la diagnosi può essere fornito anche dagli esami di laboratorio ed in particolare dalla ricerca degli autoanticorpi anti-Ro/SSA e anti-La/SSB che sono gli unici inclusi nei criteri classificativi internazionali (7). Nell'algoritmo diagnostico, però, la biopsia delle ghiandole salivari minori rappresenta l'indagine "gold standard" ed è universalmente considerata come il criterio più specifico per la diagnosi di SjS (82-95%) (35). La sensibilità dell'esame è più bassa (75-83%) e la percentuale dei falsi negativi è intorno al 20% (36). L'esame viene effettuato praticando una incisione di 1,5-2 cm tra la linea mediana e la commissura della mucosa buccale del labbro inferiore. L'incisione viene effettuata su mucosa integra e le ghiandole prelevate, una volta incluse in formalina, vengono sottoposte all'attenzione del patologo (25). Allo studio istopatologico la ghiandola può mostrare un diverso grado scialoadenite (37, 38). Una scialoadenite aspecifica di grado lieve o moderato non è considerata sufficiente per la diagnosi di SjS, mentre un quadro di scialoadenite focale con almeno un cluster di 50 linfociti per 4 mm² di tessuto (focus) è compatibile con la diagnosi di malattia, anche in accordo con i criteri internazionali (7). Una distribuzione linfocitaria periduttale è inoltre considerata tipica delle forme di SjS primitivo, mentre la distribuzione perivascolare caratterizza prevalentemente le forme di SjS secondaria (38). L'esame istologico delle ghiandole salivari minori non è esente da limiti. Essi sono legati alla sua invasività, all'andamento fluttuante del grado di infiltrazione nelle ghiandole nonché alla necessità di prelevare un campione di tessuto sufficientemente grande considerando la variabilità inter-ghiandolare dell'infiltrato. Un altro limite dell'esame è la riproducibilità del risultato che è in parte

condizionata dall'area ghiandolare esaminata e dalla qualità tecnica del materiale (36). In conclusione, ad oggi non sono stati identificati biomarkers specifici per la diagnosi di SjS, in grado di permettere di formulare ipotesi prognostiche in merito al suo decorso. Anche se la malattia ha un carattere generalmente benigno, tuttavia, considerando il potenziale rischio linfoproliferativo, è auspicabile che possano essere disponibili mezzi diagnostici sempre meno invasivi e più specifici per la SjS.

Ib. SjS: Modificazioni qualitative e quantitative nella composizione della saliva

La SjS, attraverso il sovvertimento strutturale progressivo delle ghiandole salivari e le alterazioni dei processi riassorbitivi e secretivi, determina una riduzione del flusso salivare e può indurre svariate modificazioni della composizione della saliva stessa.

La valutazione quantitativa del flusso salivare viene effettuata, in accordo con i criteri classificativi internazionali, mediante scialometria basale considerando suggestivi di malattia valori uguali o inferiori a 1.5 ml/15 min (7). In realtà, un recente studio olandese ha evidenziato come la riduzione del flusso salivare sia legata, inizialmente, solo ad una riduzione del flusso delle ghiandole sottomandibolari e sottolinguali e come, solo in una fase più avanzata di malattia, si verifichi anche il coinvolgimento delle parotidi (39). In pratica vi sarebbe una progressione temporale nel coinvolgimento delle ghiandole salivari maggiori con l'interessamento, prima, delle sottomandibolari e delle sottolinguali e, dopo, delle parotidi. Lo stesso studio ha confermato come, nella storia naturale della malattia, la composizione della saliva subisca dei cambiamenti con un aumento della concentrazione assoluta del cloro e del sodio e una riduzione dei fosfati. Questi dati confermano studi biochimici precedenti che, fin da metà degli anni '80, hanno iniziato a descrivere come nella saliva dei pazienti con SjS vi fosse un aumento della concentrazione del sodio e del cloro e anche delle proteine totali, dell'albumina, delle IgG e delle IgA (40, 41). Parallelamente, però, è emerso che, anche se la concentrazione assoluta di tali soluti è aumentata, il loro output/minuto è in realtà ridotto e questo dato sarebbe quello in maggior misura responsabile delle alterazioni del cavo orale descritte in corso di malattia (42). Progressivamente, nel tempo, sono state descritte anche ulteriori modifiche a carico della lattoferrina e della beta-2-microglobulina, del lisozima, delle metalloproteinasi MMP-2 e MMP-9 e della callicreina che risulterebbero aumentate, nonché sono state osservate una riduzione nell'attività dell'amilasi e una riduzione del pH salivare (43-47). Gli studi biochimici finora condotti sulla saliva dei pazienti con SjS non sono completamente confrontabili e omogenei. Il principale limite è legato alla difficoltà nel reperire da tutti i pazienti un quantitativo di saliva sufficiente per poter studiare i diversi analiti. Per ovviare ai problemi della raccolta salivare molti studi sono stati condotti su flusso salivare stimolato o selettivamente prelevato da alcune ghiandole, generalmente le parotidi. La stimolazione consente di ovviare al limite del reperimento del campione, tuttavia, l'aumento del flusso può influenzare la concentrazione di alcune proteine che possono risultare ridotte e modificare il pH salivare, aumentandolo. La valutazione del solo flusso

parotideo, inoltre, può fornire risultati parziali in considerazione dell'apparente impegno più tardivo, da parte della malattia, delle parotidi rispetto alle sottomandibolari e alle sottolinguali (39). I parametri oggi ritenuti più sensibili (0.85) e specifici (0.96) sono la combinazione del flusso sottomandibolare e sottolinguale stimolato e la valutazione della concentrazione salivare parotidea del sodio e del cloro (48). Complessivamente, ad oggi, la scialometria e gli studi biochimici condotti sulla saliva risultano in larga parte poco confrontabili, scarsamente riproducibili e di dubbia utilità diagnostica. E' verosimile che la possibilità identificare specifici biomarkers a livello salivare, espressi in maniera diversa nei pazienti rispetto ai controlli, e negli stessi pazienti a seconda dell'attività di malattia, possa consentire di ottenere uno strumento diagnostico non invasivo di indubbia utilità nella cura della SjS; da qui il crescente interesse verso studi di proteomica volti a caratterizzare il profilo proteico della saliva dei pazienti con SjS, valutando simultaneamente un ampio numero di proteine e a partire da minime quantità di fluido salivare dell'ordine di microlitri.

Ic. La proteomica

Il termine “proteomica”, coniato in analogia con il vocabolo genomica nel 1995, indica lo studio di tutte le proteine espresse da un organismo, tessuto o cellula in un preciso istante. (49). Il proteoma è un’entità dinamica perché non solo cellule di uno stesso organismo esprimono proteine differenti, ma anche lo stesso tipo di cellula, in condizioni diverse (età, malattia, ambiente), è caratterizzato da proteine diverse (49). L’analisi diretta delle proteine, rispetto ad un approccio genomico, consente, quindi, di ottenere informazioni precise sui livelli delle proteine presenti, in quel momento, in una cellula o in un fluido biologico rilevandone, inoltre, le possibili modificazioni post-traduzionali (come ad esempio la fosforilazione), che determinano la funzione delle proteine e che risultano particolarmente importanti nella trasduzione del segnale (50, 51).

Negli ultimi anni la proteomica è progredita con crescente interesse nel mondo scientifico e, al momento, è usata come un moderno strumento nella scoperta di farmaci, per la determinazione di processi biochimici implicati nelle malattie, per monitorare processi cellulari, per caratterizzare sia i livelli di espressione che le modifiche post-traduzionali delle proteine, per ricercare differenze tra fluidi biologici o cellule di soggetti sani e malati e per identificare markers di una malattia e possibili candidati per l’intervento terapeutico (52).

Gli studi di proteomica vengono tradizionalmente distinti in tre aree: la *proteomica funzionale* che permette la caratterizzazione dell’attività, delle interazioni e della presenza di modificazioni post-traduzionali delle proteine, per la descrizione a livello molecolare dei meccanismi cellulari; la *proteomica d’espressione* che fornisce la descrizione dell’intero proteoma di una cellula, organismo o tessuto; la *proteomica strutturale* che ha l’obiettivo di identificare e mappare le proteine presenti a livello degli organuli cellulari chiarendone le interazioni reciproche (52).

Le tecnologie proteomiche, a causa della diversità delle proteine, sono le più varie e integrano metodi biologici, chimici ed analitici; la principale tecnologia utilizzata è, però, la spettrometria di massa (MS) che viene associata a metodi differenti di separazione delle proteine (53, 54). La MS è una tecnica altamente sensibile e versatile per lo studio delle proteine e la combinazione della MS, per l’identificazione proteica, con l’elettroforesi bidimensionale (2-DE), come tecnica separativa ad alto potere risolutivo, è il metodo classico e più utilizzato (52).

L'elettroforesi bidimensionale (2-DE) consente di separare, visualizzare, quantificare ed identificare centinaia di proteine a seconda del loro punto isoelettrico e peso molecolare, in un singolo gel, partendo da campioni di complesse miscele proteiche estratte da cellule, tessuti o altri campioni biologici.

La tecnica, introdotta nel 1975, separa le proteine in due step distinti (Fig.1):

1) la 1° dimensione, *Iso-Elettro Focusing (IEF)*, separa le proteine secondo il loro punto isoelettrico (pI).

2) la 2° dimensione, l'*elettroforesi su gel di poliacrilammide (SDS-PAGE)*, separa le proteine secondo il peso molecolare (PM).

Con la 2-DE si possono separare migliaia di proteine, anche quelle che differiscono per un solo amminoacido o per piccole differenze di pI e/o PM, ed ogni spot ottenuto corrisponde ad una singola specie proteica. Per una buona elettroforesi bidimensionale è essenziale un'adeguata preparazione dei campioni: il processo dovrà risultare in una completa solubilizzazione, disaggregazione, denaturazione e riduzione delle proteine del campione. Per la strategia di preparazione dei campioni è importante considerare lo scopo dello studio, infatti step addizionali possono aumentare la qualità del risultato finale, ma portano anche alla perdita di proteine (55).

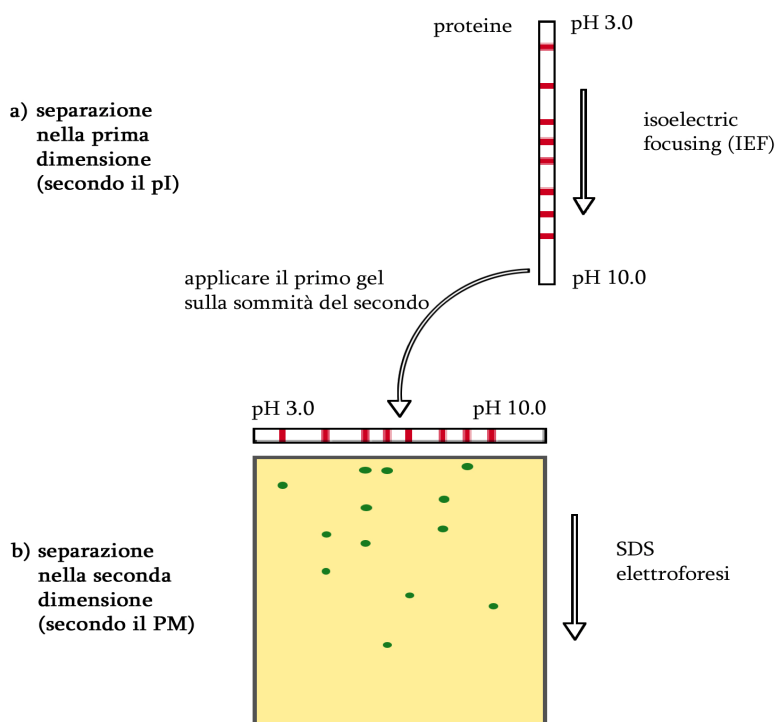


Fig. 1: Elettroforesi bidimensionale.

Prima dimensione

L'IEF è un metodo elettroforetico che separa le proteine secondo il loro punto isoelettrico (pI) utilizzando come supporti delle strip di gel di poliacrilammide. Le proteine sono molecole anfotere: presentano carica netta positiva, negativa o nulla a seconda del pH dell'ambiente in cui si trovano: sono cariche positivamente a pH minori del loro pI e negativamente a pH maggiori. Il punto isoelettrico è il valore di pH al quale la carica netta della proteina è zero. In un gradiente di pH, sotto l'influenza di un campo elettrico, le proteine si muovono fino alla posizione nel gradiente alla quale la loro carica netta è nulla; ad esempio una proteina con carica positiva migrerà verso il catodo, riducendo progressivamente la sua carica positiva, mentre si muove attraverso il gradiente, finché non raggiunge il suo pI. Questo è l'effetto focusing dell'IEF, che concentra le proteine ai loro pI e permette di separarle sulla base di piccole differenze di carica.

La risoluzione del campione è determinata dall'ampiezza del gradiente di pH e dalla forza del campo elettrico. Si utilizzano comunemente voltaggi alti (oltre 1000 V): quando le proteine hanno raggiunto la posizione finale nel gradiente di pH, nel sistema c'è un piccolo movimento ionico che risulta in una corrente finale molto bassa (sotto 1 mA).

L'IEF effettuato in condizioni denaturanti dà la più alta risoluzione ed i risultati migliori.

Originariamente il metodo prevedeva l'utilizzo di tubi di gel di poliacrilammide con gradienti generati da miscele di anfoliti, piccoli polimeri anfoteri che, sotto l'influenza di un campo elettrico, migrano e si allineano secondo i pI, dando un gradiente continuo (Klose J. 1975). A causa delle limitazioni e dei problemi di questi supporti, sono stati sviluppati dei gel a gradiente di pH immobilizzato (IPG), creati incorporando covalentemente un gradiente di gruppi acidi e basici nel gel di poliacrilammide (57). Per le strip sono utilizzate molecole ben caratterizzate, monomeri di acrilammide legati ognuno ad un singolo gruppo basico o acido. Le strip IPG sono prodotte su supporti in plastica usando due soluzioni: una miscela acida ed una basica di monomeri di acrilammide (entrambe contenenti inoltre bisacrilammide e catalizzatori). Le concentrazioni dei gruppi nelle due soluzioni determinano il range di pH del gradiente prodotto (Fig. 2). I gel sono poi lavati, disidratati e tagliati a strisce. In commercio si trovano strip (Amersham Biosciences, Sigma, etc.) di varie lunghezze (7-11-13-18-24 cm) e con vari intervalli di pH (3-10; 4-7; 6-11; 6-9; 3,5-4,5; etc), lineari (L) e non lineari (NL). L'uso delle strip IPG aumenta la riproducibilità e la qualità dei risultati (58).

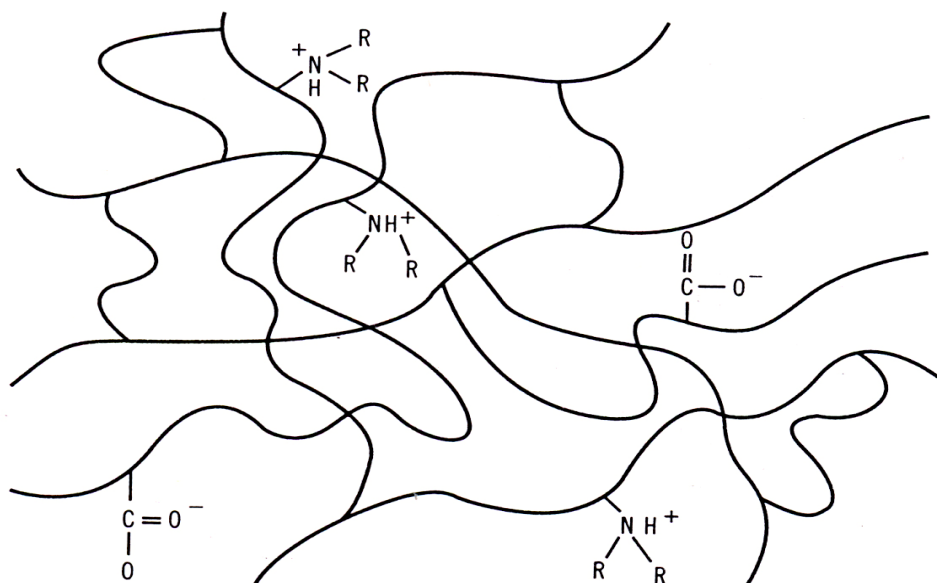


Fig. 2: Rappresentazione grafica della matrice del gel di poliacrilammide con legati i gruppi acidi e basici.

Seconda dimensione

All'IEF segue l'SDS-PAGE, una tecnica elettroforetica che separa i polipeptidi secondo la massa molecolare, utilizzando gel di poliacrilammide. Il sodio dodecil solfato (SDS) è un detergente anionico che in soluzione acquosa stabilizza le molecole proteiche denaturate formando attorno ad esse un guscio di solvatazione (1,4 g SDS/g proteine) che genera micelle dotate della stessa carica elettrica. In questo modo la specifica carica elettrica di una catena polipeptidica viene mascherata dalle cariche negative presenti sulle micelle formate dalle molecole di SDS ed ogni aggregato solubilizzato, proteina-SDS, viene a presentare identica carica negativa per unità di massa. Le particelle anioniche si spostano nel gel di acrilammide, che agisce da setaccio molecolare, separandosi in base al loro peso molecolare mentre migrano in direzione dell'anodo (55).

Per la *visualizzazione dei risultati* possono essere utilizzati molti metodi e le caratteristiche richieste sono: alta sensibilità, ampio range di quantificazione, compatibilità con la spettrometria di massa, bassa tossicità. I metodi più comunemente utilizzati sono il SILVER STAINING o colorazione argentea che è un processo multi-step a vari reagenti molto sensibile (1 ng) o il COOMASSIE STAINING (55). Questo ultimo è circa 50-100 volte meno sensibile (30-50 ng) della colorazione all'argento ma è il solo compatibile con la successiva MS (59).

Le immagini dei gel vengono poi acquisite tramite scanner ed analizzate al computer con software appositi per analizzare complessi campioni proteici separati con l'elettroforesi bidimensionale: un esempio è il software Amersham Biosciences ImageMaster TM 2D Platinum Elite. E' così possibile individuare proteine mancanti o modificate, quantificare gli spot proteici e valutare i cambiamenti nell'espressione proteica in diversi campioni (come controlli vs patologici) (60).

Gli spots proteici di interesse possono essere ulteriormente caratterizzati mediante **spettrometria di massa (MS)**. Uno spettrometro di massa è uno strumento analitico in grado di misurare la massa molecolare di una molecola dopo che essa sia stata ionizzata, ossia dopo che gli sia stata impartita una carica elettrica. Esso è infatti in grado di separare gli ioni molecolari in base al loro rapporto massa/carica. La formazione di ioni di campione in fase gassosa è un prerequisito essenziale per i processi di separazione e di rivelazione tipici di uno spettrometro di massa (61, 62). Esistono molte sorgenti di ionizzazione, ma le più usate nel campo dei peptidi e delle proteine sono la sorgente **MALDI** (matrix-assisted laser desorption/ionization), **SELDI** (surface enhanced laser desorption/ionization) e la sorgente **ESI** (elettrospray ionization) (63). La sorgente MALDI, la cui messa a punto risale alla fine degli anni '80, rappresenta una tecnica di ionizzazione "soft" e quindi applicabile a molecole grandi, non volatili o termicamente poco stabili. La tecnica di ionizzazione del MALDI è detta per desorbimento ed è un processo in cui una molecola viene sia evaporata da una superficie che ionizzata. Il campione viene miscelato ad una matrice (di solito acidi organici non volatili, in modo da ottenere un rapporto matrice/campione pari a 10.000:1) e posto, quindi, su un supporto di acciaio dove viene lasciato cristallizzare. La superficie del campione viene bombardata con fotoni ad alta energia derivanti da un raggio laser pulsato (λ 337 nm). L'impatto deposita energia sul campione, direttamente o mediante la matrice, e porta al trasferimento delle molecole campione in fase gassosa ed alla loro ionizzazione. Nel MALDI si assiste ad una ionizzazione per protonazione ossia le molecole catturano protoni caricandosi positivamente (fig 3) (63). La tecnica SELDI, utilizzata a partire dagli anni '90, consente di separare gli analiti in base alla carica di superficie ed è particolarmente utile nell'identificare ioni di bassa massa e di carica basica. Nella ionizzazione per elettro-nebulizzazione (ESI), infine, gli ioni si formano da soluzioni che vengono finemente nebulizzate attraverso un capillare tenuto ad alto potenziale elettrico. Gli ioni dell'analita, nelle goccioline cariche, vengono volatilizzati in seguito alla rimozione del solvente per

evaporazione e diretti, attraverso un sistema di trasferimento ionico, all'analizzatore di massa (64).

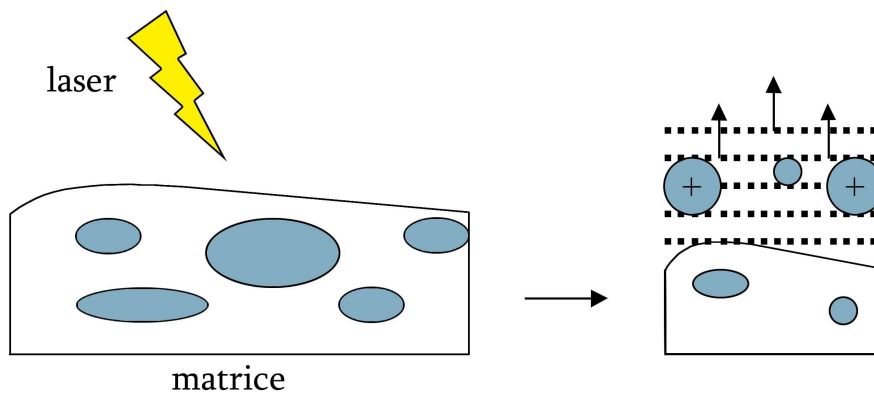


Fig. 3 : MALDI

Una volta ionizzate, le molecole vengono identificate in base al rapporto massa/carica. Il tipo di analizzatore di massa che viene maggiormente usato per l'approccio proteomico classico è il **TOF** (time of flight). Il TOF è essenzialmente costituito da un tubo di lunghezza l nota dove vi è assenza di campo elettrico, ma un'elevata condizione di vuoto. Il vuoto è necessario per permettere agli ioni di raggiungere il detector senza collidere con altre molecole gassose. Queste collisioni potrebbero ridurre la risoluzione e la sensibilità dello strumento e provocare frammentazioni degli stessi ioni. Nel MALDI-TOF un impulso laser desorbe e ionizza le biomolecole. Gli ioni vengono accelerati tramite un voltaggio elevato, acquisendo una velocità che dipende dalla massa: gli ioni leggeri acquisiscono una velocità più elevata rispetto a quelli più pesanti. Entrando in una regione priva di campo elettrico ogni ione mantiene una velocità costante fino a che non raggiunge il rivelatore. Gli ioni di massa differente possono quindi essere separati secondo il tempo: gli ioni più pesanti impiegano più tempo di quelli leggeri. Rilevando il numero degli ioni che arrivano a tempi diversi, è possibile calcolare e visualizzare uno spettro di massa del campione nel quale sono presenti picchi diversi che rappresentano la composizione in ioni con un diverso rapporto massa/carica. Poiché lo stato di carica è solitamente di +1, negli esperimenti di MALDI, è possibile identificare i picchi come rappresentativi delle masse (Fig 4).

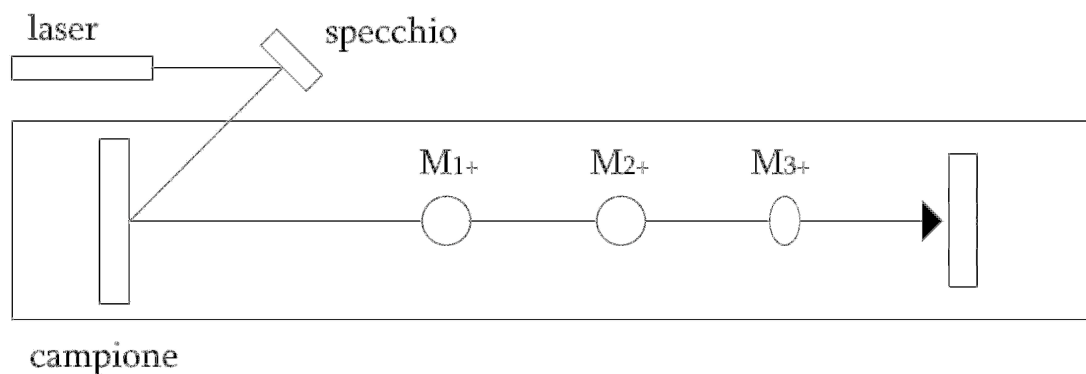


Fig. 4: MALDI-TOF

La MS crea una lista di massa dai peptidi analizzati. Tale lista di massa dei peptidi sconosciuti viene comparata con un database, costituito da proteine note. Comparando la lista di massa dei peptidi della proteina sconosciuta con le liste di massa dei peptidi noti presenti nel database viene effettuata l'identificazione (64) La quantità minima di campione necessaria per l'analisi dipende dalla purezza del campione e di solito è nell'ordine di poche picomoli.

Il vasto range di massa letto, tra 1 e 300 kDa, l'alta accuratezza e la sensibilità rendono il MALDI un metodo d'elezione per l'analisi di tutti i tipi di biomolecole (proteine, acidi nucleici, carboidrati) (65).

In combinazione con l'elettroforesi bidimensionale (e con i database di proteine) il MALDI è particolarmente utilizzato per l'identificazione di spot proteici attraverso 2 approcci principali: la *peptide-mass fingerprinting* (analisi della massa dei digeriti proteolitici) o la *peptide sequencing* (66).

I campioni, di solito, sono separati su un gel e gli spot proteici di interesse sono tagliati e trattati con tripsina, un enzima in grado di rompere i legami peptidici in cui è coinvolto un residuo di arginina o lisina; la miscela di frammenti proteici (peptidi) ottenuta dopo digestione enzimatica è purificata e sottoposta ad analisi di massa. La massa dei peptidi può essere misurata con maggior precisione rispetto a quella delle proteine intatte: i peptidi danno origine ad una library di masse molecolari derivate direttamente dalle proteine, che possono essere identificate con tecniche computazionali e tramite l'utilizzo di database (67). Se la proteina non risulta presente nei database, è possibile ottenere informazioni sulla sequenza dal MALDI con un protocollo di degradazione di Edman modificato: questo è un metodo comune per l'analisi della sequenza delle proteine, che utilizza ripetuti cicli di

rottura dei singoli amminoacidi dal terminale amminico (tramite peptidasi) e successiva identificazione degli amminoacidi staccati con cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC). La miscela di peptidi è analizzata e la sequenza codificata tramite differenze di massa (peptide ladder sequencing) (Fig. 5).

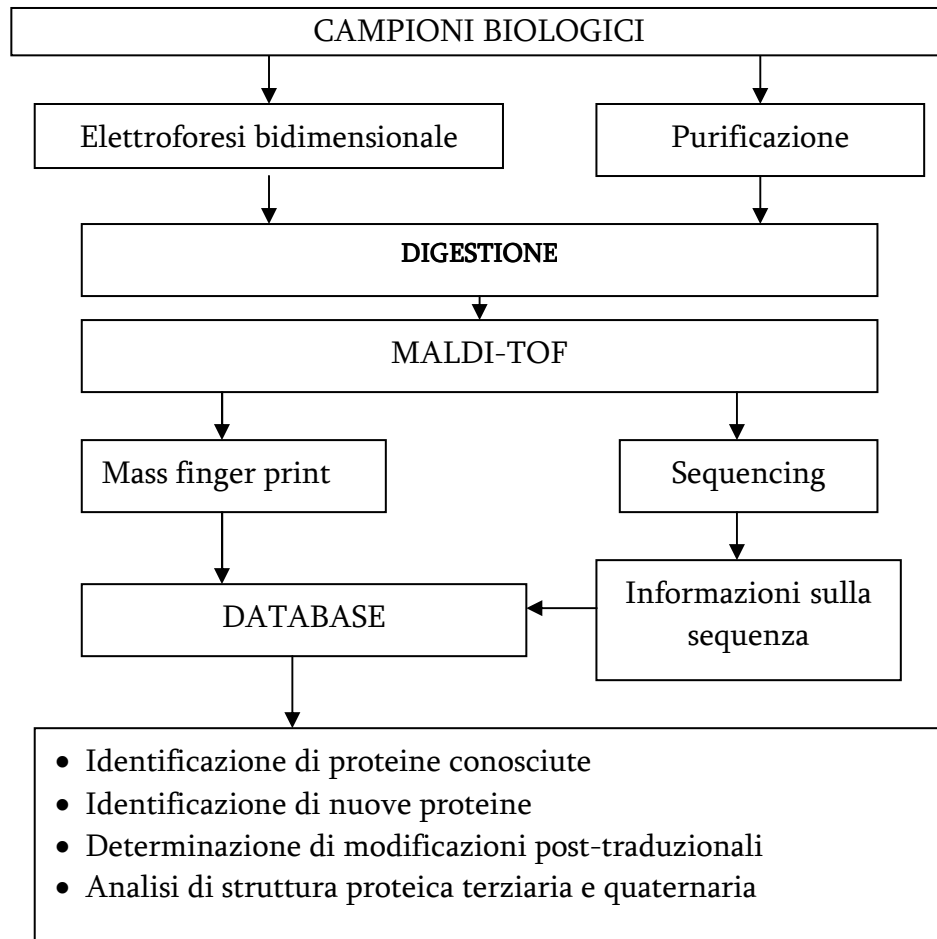


Fig. 5: Schema per l'identificazione di proteine.

Id. Applicazioni cliniche dell'analisi proteomica allo studio della saliva

La saliva in condizioni fisiologiche svolge alcune funzioni fondamentali come: lubrificare e pulire i tessuti orali facilitando il linguaggio, la deglutizione e l'ingestione di cibi; mantenere l'omeostasi nella cavità orale attraverso i tamponi carbonato e fosfato; rimineralizzare i denti con calcio e fosfato; proteggere la superficie dei denti e delle mucose attraverso un'importante azione antimicrobica (lisozima, cistatine, immunoglobuline, lactoferrina, istatine); iniziare la digestione degli amidi grazie all'amilasi salivare (68). La saliva è costituita per il 90% dai fluidi secreti dalle ghiandole salivari maggiori (parotidi, sottomandibolari, sottolinguali) e minori (si trovano nel labbro inferiore, lingua, palato, guance e faringe) e per un 10% è rappresentata dal fluido gengivale crevicolare. La sua composizione è caratterizzata principalmente da acqua (99%), elettroliti ma anche proteine di varia natura (enzimi, mucine, immunoglobuline) (68).

L'analisi della saliva, rispetto ad altri fluidi biologici, offre alcuni vantaggi come il fatto che possa essere raccolta in modo non invasivo da personale con preparazione limitata e senza particolari attrezzature, facilmente anche da pazienti meno collaboranti (bambini, anziani, insufficienti mentali) e che possa fornire un approccio poco costoso per lo screening di grandi popolazioni. I limiti dell'analisi salivare sono, viceversa, rappresentati dall'alta concentrazione di mucine, di residui e di batteri nonché dalla sua alta attività proteolitica (69). La raccolta di saliva direttamente dalle ghiandole che la producono può essere utile per individuare patologie specifiche delle ghiandole, ma oggi, sempre più frequentemente, nella diagnosi delle malattie sistemiche, è la saliva presente nel cavo orale che viene più frequentemente utilizzata; tale utilizzo è in larga parte giustificato dal fatto che la saliva del cavo orale contiene alcuni costituenti del siero che raggiungono le ghiandole salivari per diffusione passiva, per ultrafiltrazione attraverso le giunzioni intracellulari o attraverso il flusso del fluido gengivale (70). Certamente i livelli di certi costituenti serici nella saliva non sono sempre un riflesso dei livelli di questi markers nel siero, ma c'è un crescente interesse nell'uso della saliva e soprattutto nello studio delle proteine salivari per scopi diagnostici, specie nel caso di malattie sistemiche ereditarie, autoimmuni, infettive, nelle neoplasie del cavo orale e per le malattie virali, nonché anche per monitorare i livelli di farmaci, sostanze d'abuso ed ormoni (70, 71). In questo senso, è stato ipotizzato che nella fibrosi cistica, ad esempio, l'antigene carcinoembrionario o la glicosilazione di alcune mucine salivari possano fungere da biomarkers di malattia mentre,

nei pazienti con diabete mellito, la concentrazione salivare di amilasi e IgA salivari risultino aumentate (72).

Negli ultimi cinque anni la ricerca dei biomarkers salivari di malattia è stata potenziata grazie alla tecnologia proteomica che ha permesso di mappare le proteine presenti nella saliva dei soggetti sani analizzando sia il fluido salivare in toto (69, 72-74) che la pellicola salivare adesa ai denti (75), il fluido creviculare (76) e, infine, anche i secreti ghiandolari selettivamente prelevati dalle parotidi, dalle sottomandibolari e dalle sottolinguali (77,78). Il confronto tra il pattern proteico salivare dei soggetti sani e dei malati sta consentendo di rilevare livelli di proteine specifiche che potrebbero essere usati come biomarkers di malattia. E' possibile ipotizzare, con tale approccio, di poter fornire anche informazioni riguardo variazioni semiquantitative sui livelli specifici di ciascuna proteina e rilevare la presenza di isoforme dovute a modificazioni post-traduzionali come fosforilazioni e glicosilazioni. Analisi in questo senso sono già state effettuate per il lichen planus, per alcune neoplasie del cavo orale e della testa e sono in corso per numerose malattie sistemiche (79, 80). Un lavoro preliminare è stato recentemente pubblicato anche per la SjS ma limitatamente all'analisi del secreto parotideo stimolato (81). Questo lavoro, che si colloca nel più ampio panorama delle recenti applicazioni della proteomica allo studio delle malattie reumatiche (Tabella 3), ha messo in luce importanti differenze qualitative e quantitative nei pazienti con SjS evidenziando, in particolare, la riduzione dell'amilasi e della carbonato deidrogenasi e l'aumento dei livelli di alcune proteine come la beta-2-microglobulina, il lisozima C, la cistatina C, la catena immunoglobulinica leggera Igk e il recettore polimerico delle IgG. Alla luce dei risultati incoraggianti finora ottenuti, lo studio delle proteine salivari sembra poter aprire nuovi sbocchi e nuove potenzialità per la ricerca sulle malattie reumatiche, specie nel caso di malattie come la SjS che colpiscono elettivamente le ghiandole salivari.

Tabella 3: *Analisi Proteomica in Reumatologia*

| Malattia | Autore | Materiali |
|---|--------------------------------|---------------------------|
| Osteoartrite | Hermansson M. et al. 2004 (82) | Cartilagine patologica |
| Osteoartrite | De Ceuninck F et al. 2005 (83) | Cartilagine patologica |
| Osteoartrite | Ruiz-Romero C et al. 2005 (84) | Cartilagine patologica |
| Artrite Reumatoide | Sinz A. et al. 2002 (85) | Siero, liquido sinoviale |
| Artrite Reumatoide | Liao H. et al. 2004 (86) | Siero, liquido sinoviale |
| Artrite Reumatoide | Drynda S et al. 2004 (87) | Siero, liquido sinoviale |
| Artrite Reumatoide | de Seny D et al. 2005 (88) | Siero |
| Artrite Reumatoide | An Y et al. 2005 (89) | Siero |
| Artrite Reumatoide, Spondiloartrite, Osteoartrite | Tilleman K et al. 2005 (90) | Sinovia |
| Artrite cronica giovanile | Miyamae T et al. 2005 (91) | Siero |
| Sindrome di Sjogren | Tomosugi N. et al. 2005 (92) | Lacrime |
| Sindrome di Sjogren | Ryu O. et al. 2006 (81) | Saliva (flusso parotideo) |
| Granulomatosi di Wegener | Stone JH. et al. 2005 (93) | Siero |
| Sclerodermia | Fietta A. et al. 2006 (94) | Liquido broncoalveolare |

II. SCOPO DEL LAVORO

Lo scopo di questa tesi è stato quello di caratterizzare il pattern proteico della saliva di pazienti con SjS primitiva utilizzando la tecnologia proteomica. Per lo studio è stato scelto di analizzare il proteoma salivare, inteso come il completo set di proteine presenti nella cavità orale in un dato momento, combinando l'elettroforesi bidimensionale con la spettrometria di massa MALDI-TOF. La scelta della saliva è stata effettuata in relazione al caratteristico impegno clinico delle ghiandole salivari nella SjS, e considerando anche il crescente interesse per la saliva come strumento diagnostico in molte malattie sistemiche; essa, infatti, si configura come un fluido biologico più facilmente reperibile rispetto al siero e con una minore complessità in termini di numero di proteine e variabilità.

I risultati ottenuti sono stati confrontati, in primis, con soggetti sani che presentassero caratteristiche comparabili per sesso e per età.

Successivamente, la popolazione di controllo è stata allargata ad un gruppo di controllo "patologico" eterogeneo con finalità comparative diverse. Sono stati inclusi, allora, nello studio soggetti con xerostomia idiopatica, non affetti da SjS, allo scopo di valutare quali modificazioni del profilo proteico potessero rispecchiare più da vicino le modificazioni del cavo orale imputabili alla secchezza della mucosa orale di per sé. Sono poi stati studiati pazienti con profilo auto-anticorpale analogo ai soggetti con SjS e, nella fattispecie con anticorpi anti-Ro/SSA e anticorpi anti-Ro/SSA + anti-La/SSB, ma non affetti da xerostomia, allo scopo di valutare se esistessero eventuali correlazioni tra il profilo auto-anticorpale e le modificazioni nei livelli di proteine espresse. Infine, sono stati considerati pazienti affetti da un'altra malattia immunomediata capace di coinvolgere, anche se con meccanismi diversi, le ghiandole salivari: la Sclerodermia. La Sclerodermia è una connettivite sistemica, a patogenesi autoimmune, caratterizzata da una progressiva fibrosi che coinvolge la cute e gli organi interni (polmone, tratto gastroenterico, rene, cuore) (95). La malattia è provocata da una incontrollata proliferazione del tessuto connettivo e della matrice extracellulare ad opera dei fibroblasti cui si associano alterazioni vascolari localizzate soprattutto a livello del circolo arterioso più periferico (96, 97). Nella storia naturale della malattia è descritto un potenziale coinvolgimento delle ghiandole salivari di tipo fibrotico direttamente legato alla malattia. L'analisi di tipo istopatologico delle ghiandole salivari di pazienti con Sclerodermia ha, infatti, documentato un aumento del numero delle mast-cellule tissutali nonché un incremento nell'espressione delle isoforme del TGFβ2 e β3 a livello dei fibroblasti ghiandolari; elementi cellulari entrambi coinvolti nei

processi fibrotici (98). Poiché la Sclerodermia può, tuttavia, presentarsi in associazione alla SjS (95) ed è possibile, in questo caso, che i pazienti presentino un coinvolgimento delle ghiandole salivari legato alla sindrome di Sjogren secondaria, nello studio questo ultimo gruppo di pazienti è stato escluso. In conclusione, il gruppo di controllo patologico è risultato costituito da:

- a. soggetti con xerostomia idiopatica
- b. soggetti affetti da Sclerodermia
- c. soggetti asintomatici con anti-Ro/SSA
- d. soggetti asintomatici con anti-Ro/SSA e anti-La/SSB

Il confronto dei patterns proteici tra i diversi subset di soggetti arruolati nello studio ha avuto come obiettivo principale quello di evidenziare le alterazioni qualitative e quantitative peculiari solo dei pazienti con diagnosi di SjS primitiva, nel tentativo di isolare biomarkers specifici di malattia che avessero una potenziale valenza diagnostica per la SjS primitiva. Nell'ambito degli obiettivi secondari si è cercato di giustificare tali alterazioni alla luce delle più recenti acquisizioni eziopatogenetiche e cliniche disponibili per la malattia.

III. MATERIALI E METODI

IIIa. Pazienti

Nello studio sono stati arruolati 15 pazienti di sesso femminile ed età media $49,38 \pm 12,54$ ($M \pm DS$), affette da SjS primitiva e seguite presso l'U.O di Reumatologia dell'Università di Pisa. La diagnosi è stata formulata, nella totalità dei casi, in accordo con i più recenti Criteri Americani ed Europei per la malattia (7). La sintomatologia soggettiva dei pazienti, relativa alla secchezza oculare e all'impegno delle ghiandole salivari, è stata raccolta mediante apposito questionario validato. Per l'obiettivazione della secchezza oculare sono stati eseguiti nella totalità dei casi test di Schirmer e Rosa Bengala (o verde di lissamina) ed in tutti i casi sono stati determinati il profilo bio-umorale (comprensivo dell'elettroforesi proteica) e la ricerca degli autoanticorpi non organo specifici. In particolare, la ricerca degli anticorpi antinucleari, degli anti-Ro/SSA e anti-La/SSB e del fattore reumatoide è stata effettuata, rispettivamente, mediante immunofluorescenza su Hep2, contro-immunoelettroforesi e nefelometria. Infine, i soggetti sono stati sottoposti a biopsia delle ghiandole salivari minori la cui lettura è stata effettuata secondo il grading di Chisolm e Mason (99). Le caratteristiche cliniche e sierologiche delle pazienti sono riassunte nella tabella 4. In tutti i pazienti è stata esclusa un'infezione da virus HBV and HCV, virus scialotropi in grado di determinare una flogosi ghiandolare.

Il gruppo di controllo di soggetti sani è risultato costituito da 15 soggetti sani comparabili per sesso e per età con i pazienti arruolati ($45,83 \pm 17,38$; $M \pm DS$). Lo studio è poi stato allargato a 6 soggetti con sindrome secca idiopatica ($65,16 \pm 6,24$; $M \pm DS$), 6 pazienti con anticorpi anti-Ro/SSA ($38,4 \pm 9,45$; $M \pm DS$), 3 con anti-Ro/SSA ed anti-La SSB positivi senza sindrome secca ($42,33 \pm 7,63$; $M \pm DS$) e 15 pazienti con Sclerodermia diffusa e profilo autoanticorpale omogeneo positivo per anti-Scl 70 (età media $49,5 \pm 10$) ($M \pm DS$). La definizione di sindrome secca idiopatica è stata attribuita a soggetti con xerostomia apparentemente non attribuibile alle più comuni cause virologiche o farmacologiche, con profilo auto-anticorpale negativo e biopsia delle ghiandole salivari con grading di Chisolm Mason ≤ 2 . Nei soggetti asintomatici carrier di autoanticorpi la positività degli autoanticorpi anti Ro/SSA e anti La/SSB è stata confermata in almeno due successive determinazioni. La diagnosi di Sclerodermia, infine, è stata definita in accordo con i criteri classificativi internazionali (100). Sono stati esclusi dallo studio soggetti fumatori. Per l'inclusione nello studio tutti i partecipanti hanno rilasciato un consenso informato.

Tabella 4. *Caratteristiche clinico-sierologiche dei pazienti con SjS in studio*

| Caratteristica | Percentuale |
|---|--------------------|
| Xerostomia | 100% |
| Xeroftalmia | 100% |
| Test oculari (Schirmer o Rosa Bengala) | 100% |
| Uso quotidiano lacrime artificiali | 100% |
| Sensazione di sabbia negli occhi | 75% |
| Necessità di bere frequentemente nella giornata | 50% |
| Tumefazione ghiandole salivari maggiori | 15% |
| Biopsia ghiandole salivari positiva | 80% |
| FAN Hep2 > 1:160 | 85% |
| Anti-Ro/SSA | 75% |
| Anti-La/SSB | 25% |
| Ra test | 60% |
| Ipergammaglobulinemia | 80% |

IIIb. Materiali e Strumentazione

L'acqua, di grado analitico, è stata filtrata mediante l'apparecchio MilliQ (PS Whatman®, Millipore Corporation, Maid Stone, England).

Tutti i reagenti e i solventi sono stati acquistati dalle più comuni fonti commerciali.

Sono state utilizzate strip Immobiline™ DryStrip pH 3-10 L, di 18 cm, e le Ettan™ IPGphor™ Strip Holder, in ceramica, dell'Amersham Biosciences (Uppsala, Sweden).

L'apparecchio impiegato per l'isoelettrofocalizzazione è stato l'Ettan™ IPGphor™ Isoelectric Focusing System (Amersham Bioscience). Per fare i gel è stato utilizzato il Protean Plus Multicasting Chamber (Biorad).

L'apparecchio per l'elettroforesi usato è il Protean II XL Ready Gel (Biorad) con alimentatore EPS 601 Power Sully (Amersham Bioscience).

IIIc. Raccolta e preparazione del campione

I campioni di saliva dei soggetti sono raccolti tramite sputo, senza stimolazione chimica, al mattino e a digiuno. Per minimizzare la degradazione proteica, i campioni sono stati mantenuti in ghiaccio e trattati immediatamente. Da ogni soggetto sono stati ottenuti 1-2,5 ml di saliva che sono stati centrifugati a 14000 g per 20 minuti a 4°C per rimuovere materiale insolubile e cellule.

Nella preparazione il campione di saliva (già centrifugato per eliminare il materiale insolubile) viene addizionato ad acido tricloroacetico (TCA) al 20% e ditiotreitolo (DTT) allo 0,1% (1 ml di TCA per 1 ml di saliva: concentrazioni finali TCA 10% e DTT 0,05%) e le proteine vengono lasciate precipitare in ghiaccio per 30 minuti. Al termine del periodo di incubazione la sospensione è centrifugata a 14000 g per 10 minuti a 4°C. Il sovrantante viene eliminato, mentre il pellet ottenuto è risospeso con ultraturax in 2 ml di acetone a 4°C, quindi centrifugato a 14000 g per 15 minuti. Questa operazione di lavaggio con acetone freddo viene ripetuta altre due volte al fine di eliminare il TCA. Gli eventuali residui di acetone sono eliminati tramite evaporazione ed il pellet finale, che contiene le proteine presenti nella saliva, viene processato per effettuare la prima dimensione. Il pellet proteico è risospeso nella soluzione di reidratazione. La soluzione di reidratazione utilizzata è composta da:

Urea 7M – Thiourea 2M: servono per solubilizzare e denaturare le proteine così che siano presenti in una sola configurazione;

Chaps 4%: è un detergente non ionico che permette di solubilizzare le proteine idrofobiche e minimizzare l'aggregazione proteica;

Ditiotreitolo (DTT) 60mM: agente riducente, serve per rompere ogni ponte disolfuro e permettere alle proteine di distendersi completamente;

Blu di Bromofenolo 0,002%: per seguire la corsa, se il tracciante non migra all'anodo non c'è flusso di corrente;

Anfoliti (3-10) 0,5%: aumentano la solubilità delle proteine minimizzando la loro aggregazione dovuta ad interazioni carica-carica.

I campioni devono rimanere in tale soluzione 30 minuti, a temperatura ambiente, per ottenere una completa denaturazione e solubilizzazione. Una piccola aliquota del campione viene utilizzata per la determinazione della concentrazione proteica tramite il metodo RC/DC della Biorad (Peterson GL.), il volume restante viene utilizzato per la prima dimensione. Per i gel analitici le aliquote contengono 150 µg di proteine e vengono portate sino ad un volume finale di 350 µl con la soluzione di reidratazione. A questo punto i campioni possono essere utilizzati per la prima dimensione o congelati a -80°C ma in tal caso gli anfoliti sono omessi e vengono addizionati solo al momento della prima dimensione.

Dosaggio proteico RC/DC/BIORAD

Il DC protein assay è un dosaggio colorimetrico con cui viene costruita una curva di riferimento utilizzando una proteina standard che dovrà essere preparata nello stesso tampone del campione proteico di interesse. In questo caso la proteina standard albumina bovina, è risospesa nella soluzione di reidratazione. Vengono preparate quattro concentrazioni (con un volume di 25 µl) di proteina standard (0.2-0.4-0.8-1.5 mg/ml) che abbracciano l'intervallo di sensibilità del metodo (Tab.5).

Tabella 5. *Diluizioni della BSA per la retta di taratura.*

| | Rehydration | BSA | Concentrazione | µg BSA |
|--------|-------------|---------|----------------|--------|
| Bianco | 25µl | - | 0 µg/µl | 0 µg |
| 1 | 21,7µl | 3,3µl | 0,2 µg/µl | 4 µg |
| 2 | 18,3µl | 6,7µl | 0,4 µg/µl | 8 µg |
| 3 | 11,7 µl | 13,3 µl | 0,8 µg/µl | 16 µg |
| 4 | - | 25 µl | 1,5 µg/µl | 30 µg |

Per il dosaggio proteico del campione incognito si procede con una diluizione 1:10 o 1:5 dello stesso (si valuta sulla base del volume di soluzione scelto per la risospensione del campione) con la soluzione di reidratazione per avere un volume finale di 25 µl.

Il dosaggio viene effettuato in eppendorfs, in doppio; come bianco viene dosata la soluzione di reidratazione, a temperatura ambiente.

Agli standars ed ai campioni così preparati sono aggiunti 125 µl di reagente I, agitati su vortex, e incubati 1 minuto. Quindi vengono addizionati 125 µl di reagente II, agitati su vortex e centrifugati a 12000 g per 5 minuti. I sovrantanti sono scartati, e questo primo step è ripetuto variando i volumi di reagente I (125 µl) e II (40µl). Sono quindi addizionati 127 µl di reagente A* per ciascuna eppendorf, agitato e incubato per 5 min o finchè il precipitato non è completamente disciolto. Si addiziona infine 1 ml di reagente B in ciascuna eppendorf agitando immediatamente e si lascia in incubazione per 15 minuti. Al termine del periodo di incubazione si procede alla lettura dei campioni alla lunghezza d'onda di 750 nm.

Si costruisce una retta di taratura nell'intervallo di sensibilità da 5 µg a 37.5 µg: $y=Ax$, e dall'equazione della retta si procede al calcolo della concentrazione proteica per il campione incognito.

$$\frac{(\text{lettura campione} - \text{lettura bianco})}{\text{assorbanza}} \times \text{fattore diluizione} = \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$$

IIId. Elettroforesi Bidimensionale

Isoelettrofocalizzazione

La prima dimensione è effettuata su strip di 18 cm in cui è presente un gradiente lineare di pH 3-10 (Amersham Biosciences).

-Il volume caricabile su una strip da 18 cm è di 350 µl.

-Il volume del campione deve essere < al 25% del volume totale.

-Al momento vengono aggiunti 0,5% di anfoliti.

Si caricano su strip holder i 350 µl del campione (pari a 150 µg di proteine); si pone sopra l'IPG strip e si copre con l'IPG Cover Fluid (Amersham Biosciences), un olio minerale che minimizza l'evaporazione e la cristallizzazione dell'urea, prima di chiudere con l'apposito coperchietto.

Per la prima dimensione è utilizzato l'Apparecchio IPGphor (Amersham Biosciences) che permette di impostare reidratazione e IEF del campione contemporaneamente (Tabella 6). Il programma utilizzato come tempi e voltaggio applicati è sotto elencato e arriva a permettere di ottenere fino ad ottenere 70000 V totali:

Tabella 6. *Ettan IPGphor Isoelectric Focusing System.*

| | | | |
|---------------|-----|-------|------|
| reidratazione | 1h | 0V | 16°C |
| I step | 10h | 30V | 16°C |
| II step | 1h | 200V | 16°C |
| III step | 30' | 300V | 16°C |
| IV step | 3h | 3500V | 16°C |
| V step | 10' | 5000V | 16°C |
| Vi step | 12h | 8000V | 16°C |

Gli alti voltaggi raggiunti richiedono un controllo della temperatura che infatti è mantenuta a 16°C per tutta la corsa. Inoltre, dopo la reidratazione delle strip, vengono inseriti sugli elettrodi dei quadratini di una apposita carta per isoelettrofocusing (electrode pads). Tali pads vengono inumiditi con acqua MilliQ e posti tra la strip e gli elettrodi per preservare questi ultimi dalla precipitazione degli ioni.

Al termine della IEF la strip viene ripulita dall'eccesso di olio minerale e utilizzata subito per la seconda dimensione o conservata a -20 °C.

Equilibratura

Prima di effettuare la seconda dimensione la strip viene equilibrata incubandola, in successione, con:

- 1) 10 ml di SDS Equilibration Buffer + DTT 1% per 15 minuti in agitazione a temperatura ambiente;
- 2) 10 ml di SDS Equilibration Buffer + IAA 2,5% per 15 minuti in agitazione a temperatura ambiente;

L' SDS equilibration buffer contiene:

Tampone equilibrante (Tris-HCl 50 mM pH 8,8): per mantenere le strip in un range di pH appropriato per l'elettroforesi;

Urea (6 M) *Glicerolo* (30%): per ridurre l'elettroosmosi e migliorare il trasferimento delle proteine alla seconda dimensione. L'elettroosmosi è dovuta alla presenza di cariche fisse sulla strip all'interno di un campo elettrico e può interferire con il trasferimento delle proteine dalla strip al gel della seconda dimensione;

Sodio dodecil solfato (2%): denatura le proteine e forma complessi proteine-SDS carichi negativamente. La quantità di SDS legato ad una proteina, e quindi la carica negativa, è direttamente proporzionale alla massa della proteina, in questo modo l'elettroforesi separerà le proteine in base al loro peso molecolare;

Blu di Bromofenolo (0,002%): usato come agente tracciante per seguire la corsa elettroforetica;

Ditiotreitolo (1%): agente riducente per preservare lo stato ridotto delle proteine;

Iodoacetammide (2,5%; al 2° lavaggio): per alchilare i gruppi tiolici delle proteine e prevenirne la riossidazione durante l'elettroforesi.

Seconda Dimensione

La strip viene posta sopra un gel di poliacrilammide 12% (20cm×20cm×1,5mm), facendo bene attenzione che aderisca in tutta la sua lunghezza al gel, e bloccata con una soluzione di agarosio 0.1% in Running Buffer.

L'elettroforesi è effettuata in due step: per i primi 15 minuti si impostano 15 mA per gel aumentando poi la corrente a 40 mA per gel finchè il fronte del campione, visualizzato tramite il Blu di bromofenolo, esce dal fondo di corsa (circa 5:30 ore).

Per la corsa elettroforetica si utilizza il RUNNING BUFFER 10X (Tris-base 25mM, Glicina 192 mM, SDS 0.1%) diluito 1:10; la diluizione viene fatta il giorno precedente per mantenere il tampone a 4°C e poterlo utilizzare freddo.

Preparazione Del Gel 12% Nel Multicasting

Al fine di minimizzare la variabilità sperimentale e quindi aumentare la riproducibilità, i gel di acrilammide (12%) vengono preparati contemporaneamente (fino ad 8 gel-Tabella 7) utilizzando l'apparecchio Multicasting della Biorad e la corsa è condotta su di un apparecchio Protean II XI Multi-cell 2D in grado di ospitare e far correre contemporaneamente fino a 6 gel in condizioni termostatate (circa 10°C).

Tabella 7. Volumi per 6 ed 8 gel di acrilammide al 12%.

| | 6 gel | 8 gel |
|---------------------------------|----------|----------|
| H ₂ O milliQ | 142.8 ml | 190.4 ml |
| Tampone Tris 1.5M pH8.8 | 105 ml | 140 ml |
| Acrilammide/bis-acrilammide 30% | 168 ml | 224 ml |
| Ammonio persolfato 10% | 2.1 ml | 2.8 ml |
| Temed | 105 µl | 140 µl |

Colorazione dei gel

I gel bidimensionali così ottenuti sono stati colorati utilizzando una colorazione all'argento/ammoniaca.

Alla fine della seconda dimensione, il gel viene rimosso dai vetri ed è lavato con acqua deionizzata per 5 min, quindi lasciato in etanolo:acido acetico:acqua (40:10:50) per un'ora, e successivamente in etanolo:acido acetico:acqua (5:5:90) per tutta la notte. All'indomani il gel viene sottoposto ad un processo multi-step:

- Viene lavato per 5 min con acqua deionizzata;
- Si lascia per 30 min in una soluzione di 1% glutaraldeide e 0,5M sodio acetato;
- Si lava 3x10 min con acqua deionizzata;
- Viene incubato 2x30 min con una soluzione di acido 2,7-naftalene disulfonico 0,05%;
- Al termine di questo periodo di incubazione il gel è nuovamente lavato 4x15 min con acqua deionizzata;
- Viene quindi colorato in una soluzione fresca di nitrato di argento 2,5% e ammoniaca 30% per 30 min;
- Dopo la colorazione, il gel è lavato con acqua deionizzata 4x4 min e sviluppato in soluzione di acido citrico 0,01% e formaldeide 0,1% per 3:40 min;
- La reazione è stoppata con una soluzione di Tris 5% e acido acetico al 2%.

Tutte gli steps della colorazione sono condotti a temperatura ambiente e sotto agitazione, inoltre i tempi di sviluppo sono mantenuti costanti per tutti i gel per poter fare confronti quantitativi oltre che qualitativi tra gel differenti.

Gel Preparativi

Per l'identificazione delle proteine d'interesse occorre estrarre queste ultime dal gel perché possano poi essere sequenziate tramite spettrometria di massa MALDI-TOF; la colorazione all'argento utilizzata non risulta però compatibile con la spettrometria di massa, pertanto occorre realizzare gel preparativi che saranno colorati con il Coomassie Colloidale; una colorazione meno sensibile di quella all'argento.

Questa procedura richiede quindi di caricare un quantitativo maggiore di proteine, nel nostro caso abbiamo caricato 1500 µg.

Prima dimensione

Per i gel preparativi si carica un volume di campione pari a 1500 µg e si arriva ad un volume finale di 400 µl con la soluzione di reidratazione. Si utilizzano sempre strip da 18 cm con un gradiente lineare di pH 3-10 e si aggiungono al momento 0,5% di anfiliti.

Cambia il programma utilizzato (Tabella 8):

Tabella 8. *Isoelettrofocusing per gel preparativi*

| | | | |
|---------------|------|-------|------|
| reidratazione | 1h | 0V | 16°C |
| I step | 12 h | 30V | 16°C |
| II step | 11h | 200V | 16°C |
| III step | 2 h | 300V | 16°C |
| IV step | 3h | 3500V | 16°C |
| V step | 3h | 3500V | 16°C |
| VI step | 15 h | 5000V | 16°C |

Seconda dimensione e colorazione

La procedura della seconda dimensione è analoga a quella utilizzata per i gel analitici ma per la colorazione si utilizza il Coomassie Brilliant Blue G-Colloidal che, a differenza della colorazione all'argento, è compatibile con la spettrometria di massa. Il *Coomassie Colloidale* contiene:

0,12% Coomassie Brilliant Blue G-250

10% Ammonio solfato

2% Acido fosforico.

Il colorante così preparato deve essere diluito al momento dell'utilizzo con il metanolo (4 parti di colorante per 1 di metanolo) agitando per 30 secondi. La colorazione prevede pochi passaggi:

- Terminata la corsa, il gel viene lasciato per un'ora, in agitazione, nella soluzione di fissaggio contenente il 7% di acido acetico ed il 40% di metanolo;
- Il gel è messo in incubazione nel colorante dalle 2 alle 12 ore;
- Si sostituisce il colorante con una soluzione di acido acetico (10%) e metanolo (25%) mantenendo il gel in agitazione, a temperatura ambiente, per 60 secondi;
- Si cambia la soluzione con un'altra di metanolo (25%), sempre agitando il gel, sostituendola dopo pochi secondi con una nuova di metanolo (25%) che può essere lasciata fino a 24 ore.

Analisi dei Gel Tramite Image Master 2D Platinum

Le immagini dei gel sono state acquisite tramite uno scanner (Epson Expression 1680) e analizzate con il programma Image Master 2D Platinum 5.0 dell'Amersham Bioscience. Tramite software si possono mettere a confronto i gel ottenuti dall'elettroforesi bidimensionale della saliva. Gli spots proteici di ciascun gel sono selezionati, numerati e confrontati (sovrapposti). I gel sono divisi nelle diverse classi in modo che il programma sia poi in grado di effettuare un confronto tra i gel all'interno della stessa classe e tra classi diverse. Il programma permette, infatti, di evidenziare eventuali variazioni nell'entità e/o nella presenza o assenza di determinate proteine. Dopo la messa in evidenza degli spot nei gel, sempre mediante software vengono generati dei gel sintetici uno per ciascuno dei gruppi di soggetti di volta in volta esaminati. Ciascuno dei gel sintetici contiene esclusivamente gli spot comuni a tutti i singoli gel del gruppo in esame ovvero solo gli spot espressi nella totalità dei gel del gruppo di soggetti in esame può entrare a far parte del gel sintetico. La finalità dei gel sintetici è stata quella di isolare un numero definito di proteine di interesse che sono state poi caratterizzate mediante spettrometria di massa. La valutazione quantitativa della densità ottica delle proteine nei diversi gruppi di soggetti in studio è, invece, stata valutata mediante il confronto delle medie dei singoli valori ottenute considerando gli spots proteici dei singoli gel di ciascun gruppo.

IIIe. MALDI-TOF

Preparazione dei campioni per MALDI-TOF

Gli spots proteici di interesse sono tagliati dal gel utilizzando per la digestione la tripsina seguendo la seguente procedura:

- i gel ottenuti mediante 2-DE vengono trattati con bicarbonato di ammonio 50mM e acetone (AcN) 30% per 30' a temperatura ambiente
- i gel vengono disidratati per 30' in una centrifuga Hetovac (HETO, Allerod, Denmark) e quindi reidratati per 45' a 4°C in 5-20 µl di una soluzione 50 mM di bicarbonato di ammonio contenente tripsina a 6.25 ng/ µl
- Dopo il periodo di incubazione di una notte, i gel vengono disidratati in centrifuga, reidratati con 20 µl di H₂O e alla fine disidratati di nuovo
- L'eluizione dei peptidi viene effettuata con 20 µl di acido trifluoroacetico (TFA) all'0.1% per 20' a temperatura ambiente
- La soluzione di TFA contenente le proteine di è trasferita in un tubo di propilene
- Una seconda eluizione dei peptidi viene effettuata con 20 µl di TFA allo 0'1% in 50% AcN per 20' a temperatura ambiente
- Le due eluizioni vengono poste insieme e il volume complessivo viene ridotto di 1-2 µl per evaporazione
- Estrazioni di controllo vengono effettuate utilizzando parti dei gel privi di proteine
- Gli spots sono così inviati al Core Facility Proteomic (Università di Ginevra) per l'analisi spettrometrica che consente di identificare le proteine.

Identificazione proteica mediante finger printing (MALDI-TOF)

Prima del finger printing, le soluzioni contenenti i peptidi vengono addizionate con TFA allo 0.1% in 50% AcN e portate ad un volume di 5 µl. Un microlitro di ciascun campione viene depositato su una piastra 2 x 96 della MALDI e portato a secco sottovuoto. Viene aggiunto un ugual volume di matrice (10 mg/ml α -cyano-4-hydroxycinnamic acid in 50% AcN, 0.1% TFA). I campioni vengono portati a secco sottovuoto nuovamente. La MS è stata condotta mediante lo spettrometro Voyager super STR (Applied Biosystems, Foster City, CA) corredato di un laser nitrogene di 337 nm. L'analisi è stata eseguita in reflectrone con un acceleratore di voltaggio di 20 kV, un parametro di ritardo di estrazione di 350 ns, e un limite basso di massa di 850 Da. Gli spettri sono stati ottenuti dalla somma di 150-300 spari laser consecutivi. I picchi di massa sono stati estratti dagli spettri e l'identificazione proteica è stata effettuata utilizzando il MASCOT 2.1 peptide mass

fingerprint tool e il motore di ricerca ProFound del PROWL (<http://prwl.rockefeller.edu>). Come databases sono stati utilizzati il SWISS_PROT e il TrEMBL utilizzando come limiti per la ricerca i seguenti: specie umana, tolleranza della massa ± 50 ppm, clivaggio perso con la tripsina fino a 1 e modificazioni della cisterna per carbamidometilazione.

III f. Analisi Statistica

I valori di densità ottica delle proteine di interesse sono stati espressi come % di volume. L'analisi statistica di comparazione tra i livelli di espressione delle singole proteine nella saliva dei pazienti arruolati è stata effettuata mediante test ANOVA per il confronto delle medie tra più gruppi analizzati simultaneamente e mediante *t*-test per il confronto delle medie dei gruppi a due a due. Un p-value <0.05 è stato considerato statisticamente significativo.

IV. RISULTATI

IVa. ANALISI DEI GEL SINTETICI

Le figure allegate rappresentano rispettivamente le immagini dei gel sintetici e dei gel rappresentativi ottenuti dalla saliva dei soggetti sani e dei pazienti con SjS, Sclerodermia, sindrome secca, e profilo autoanticorpale patologico: anti-SSA e anti-SSA + anti-SSB positivi. (Fig 6-17 vedi allegati)

Il confronto della percentuale di volume degli spot presenti nei gel sintetici dei gruppi in esame, considerati a due a due, ha evidenziato differenze statisticamente significative nell'espressione qualitativa e quantitativa di numerose proteine salivari.

In particolare, comparando il gel sintetico ottenuto dal gruppo di pazienti affetti da SjS con quello dei controlli, è stato possibile identificare 10 spots presenti solo nel gel sintetico patologico e 4 spots presenti solo in quello dei controlli. Nell'ambito dei 10 spots è stata evidenziata la presenza di diverse proteine con pI tra 5,0 e 6,5 e PM intorno a 30-45 Kda, come il precursore della Zn- α_2 -glicoproteina (spot n° 33)*, anche se l'analisi di massa non è stata in grado di identificare la totalità degli spots (spots n°48, 46, 30, 34). E' inoltre stato possibile documentare la presenza di numerose proteine coinvolte nei processi flogistici come: la calgranulina B, la lipocalina e la fosfatidiletanolamina binding protein, nonché, spots (n°47) relativi all'espressione della catena leggera κ delle immunoglobuline. Nell'ambito degli spots presenti solo nel gel sintetico dei controlli è invece da sottolineare quello (spot n° 29) relativo alla carbonato anidrasi VI e alle cistatine e ai loro precursori (cistatina D, C, S) (spots n° 5,7,12). La tabella 9 riassume le principali differenze qualitative che lo studio ha permesso di evidenziare. La tabella 10 mostra, invece, le differenze quantitative relative alle proteine la cui espressione differisce di almeno due volte nei due gruppi. L'analisi dei gel, infatti, ha mostrato 14 spots caratterizzati da una diversa intensità tra pazienti e controlli: 10 spots mostravano un costante incremento (spots n°10, 35, 36, 32, 17, 2, 4, 18, 19, 21) nei malati rispetto ai controlli mentre 4 risultavano significativamente meno intensi (spots n°40, 9, 23, 16) nei pazienti con SjS (102,103).

**I numeri degli spots si riferiscono ai gel rappresentativi*

Tabella 9. Proteine presenti esclusivamente nel gel sintetico dei pazienti con Sjs o nei soggetti sani

| Spot No | Protein | Swiss-Prot accession no | Mr (x10 ³) | pI | sequence coverage% | Matched peptides |
|-----------------------|--|-------------------------|------------------------|------|--------------------|------------------|
| Controlli sani | | | | | | |
| 5 | Cystatin D | P28325 | 16.1 | 7.63 | 31 | 5 |
| 7 | Cystatin C precursor | P01034 | 16 | 9.00 | 49 | 14 |
| 12 | Cystatin S precursor | P01036 | 16.4 | 4.95 | 68 | 12 |
| 29 | Carbonic anhydrase VI | Q5FC00 | 35.4 | 8.43 | 24 | 9 |
| Sjs | | | | | | |
| 41 | Calgranulin B | P06702 | 13.2 | 5.71 | 76 | 9 |
| 42 | Cyclophilin A | P62937 | 18 | 7.82 | 85 | 17 |
| 43 | Lipocalin-1 precursor | P31025 | 19.4 | 5.39 | 31 | 4 |
| 45 | Phosphatidyl ethanolamine binding protein (PEBP) | P30086 | 21 | 7.42 | 92 | 20 |
| 47 | IGKC protein | Q6GMW1 | 26 | 7.55 | 41 | 8 |
| 33 | Zinc- α_2 -glycoprotein precursor | P25311 | 34 | 5.57 | 23 | 11 |

Tabella 10. Proteine espresso con diversa concentrazione nei gel sintetici dei SjS e dei controlli sani

| Spot No | Protein name | Swiss-Prot accession no. | Mr(x10 ³) | | pI | | sequence coverage % | Matched peptides | Score |
|---------|--|--------------------------|-----------------------|--------|-------|--------|---------------------|------------------|-------|
| | | | Theor | Observ | Theor | Observ | | | |
| 10 | fatty acid-binding protein(E-FABP) | Q01469 | 15.3 | 12.0 | 6.84 | 6.48 | 68 | 17 | 108 |
| 35 | ACTB protein (actin) | Q96E67 | 40.5 | 40.1 | 5.55 | 5.24 | 57 | 21 | 114 |
| 36 | β-actin fragment | Q96HG5 | 41.3 | 41.0 | 5.56 | 5.04 | 23 | 8 | 50 |
| 32 | leukocyte elastase inhibitor | P30740 | 42.8 | 40.7 | 5.90 | 6.08 | 23 | 8 | 43 |
| 17 | glutathione-S-transferase | P09211 | 23.4 | 23.4 | 5.44 | 5.56 | 32 | 6 | 48 |
| 40 | α-amylase precursor | P04745 | 58.4 | 54.9 | 6.47 | 6.40 | 62 | 31 | 177 |
| 9 | cystatin SN precursor | P01037 | 16.5 | 12.0 | 6.82 | 7.52 | 69 | 10 | 105 |
| 23 | keratin 6-L | Q5XKE5 | 58 | 33.1 | 6.75 | 4.52 | 14 | 7 | 37 |
| 16 | prolactin-inducible protein precursor(PIP) | P12273 | 16.8 | 14.8 | 8.26 | 4.64 | 69 | 10 | 105 |
| 18 | not identified | -- | nd | 23.4 | nd | 5.20 | -- | -- | -- |
| 19 | not identified | -- | nd | 23.9 | nd | 5.00 | -- | -- | -- |
| 21 | not identified | -- | nd | 24.5 | nd | 7.32 | -- | -- | -- |
| 4 | not identified | -- | nd | 11.8 | nd | 5.60 | -- | -- | -- |
| 2 | not identified | -- | nd | 42.8 | nd | 6.36 | -- | -- | -- |

Il confronto tra il gel sintetico dei pazienti con Sclerodermia e dei controlli sani ha, invece, messo in luce 20 spots che sono risultati presenti solo nelle immagini bidimensionali dei soggetti con Sclerodermia ed assenti nei controlli. Con la spettrometria di massa è stato possibile identificare 13 di tali 20 spots che sono risultati confluire in 9 proteine identificate come: ciclofillina A (spot n°42), calgranulina B (spots n°41, 52, 53, 54), psoriasina (spot n°55), beta-2-microglobulina (spot n°56), calgranulina A (spot n°57, 58), gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (spot n°64), TPI (spot n°65), complesso Arp2/3 (spot n°67) e cistatina B (spot n°59). La tabella 11 riassume questi risultati.

Nel confronto tra gel sintetico dei pazienti con Sclerodermia e SjS gli spots relativi a psoriasina (spot n°55), calgranulina A (spot n°57, 58), gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (spot n°64), TPI (spot n°65), complesso Arp2/3 (spot n°67) e cistatina B (spot n°59) e carbonato anidrasi VI (spot n°26-29) risultavano presenti solo nel gel sintetico dei pazienti con sclerodermia. Non risultavano, invece, identificabili nel gel sintetico dei pazienti con Sclerodermia gli spot relativi alla E-FABP e alla lipocalina . Ulteriori differenze tra gel sintetici dei pazienti con SjS e Sclerodermia emergevano nell'espressione delle cistatine e dei loro precursori, dell' α -amilasi salivare, della cheratina 6L, della PIP, della glutatione-S-transferasi e dell'inibitore dell'elastasi leucocitaria.

Tabella 11. Spot proteici identificati solo nel gel sintetico dei pazienti con Sclerodermia e non nei controlli

| Spot No | Protein | Swiss-Prot accession no | Mr (x10 ³) | pI | sequence coverage% | Matched peptides |
|---------|---|-------------------------|------------------------|------|--------------------|------------------|
| 41 | Calgranulin B | P06702 | 13.2 | 5.71 | 76 | 9 |
| 52 | Calgranulin B | P06702 | 13.2 | 5.71 | 53 | 5 |
| 54 | Calgranulin B | P06702 | 13.2 | 5.71 | 70 | 7 |
| 53 | Calgranulin B** | P06702 | 13.2 | 5.71 | 55 | 7 |
| 55 | Psoriasis | P31151 | 11.4 | 6.26 | 49 | 7 |
| 56 | β2-microglobulin | Q6IAT8 | 13.8 | 6.06 | 37 | 4 |
| 57 | Calgranulin A | P05109 | 10.8 | 6.51 | 62 | 8 |
| 58 | Calgranulin A | P05109 | 10.8 | 6.51 | 63 | 11 |
| 59 | Cystatin B | P04080 | 11.1 | 6.96 | 64 | 6 |
| 42 | Cyclophilin A | P62937 | 18 | 7.82 | 54 | 11 |
| 64 | Glyceraldeyde-3-**-phosphate dehydrogenase | P04406 | 35.9 | 8.58 | 23 | 5 |
| 65 | Triose phosphate isomerase | P60174 | 26.8 | 6.51 | 62 | 15 |
| 67 | Actin-related protein 2/3 complex subunit 2 | O15144 | 34.4 | 6.84 | 43 | 18 |

I risultati del confronto dei rimanenti gel sintetici sono riassunti nella Tabella 12

Tabella 12: *Gel sintetici a confronto*

| | | | | | | |
|------------|----------------------------------|---------|------|-----------------------|-----|-------------------|
| vs | Sindrome secca idiopatica | | | | | |
| SjS | lipocalina | amilasi | PEPB | Carbonato anidrasi VI | PIP | Cistatina B, D, S |

| | | | | | | |
|------------|--------------------|---------|-----------------------|-----|-------------------|--|
| vs | Anti-Ro/SSA | | | | | |
| SjS | lipocalina | amilasi | Carbonato anidrasi VI | PIP | Cistatina B, D, S | |

| | | | | | | |
|------------|----------------------------------|---------------------------------|--|--|-----|-------------|
| vs | Sindrome secca idiopatica | | | | | |
| SjS | lipocalina | Inibitore elastasi leucocitaria | | | PIP | Cistatina D |

| | | | | | | |
|---------------------|----------------------------------|-------------|----------------|--------------|-----|----------------|
| vs | Sindrome secca idiopatica | | | | | |
| Sclerodermia | Cistatina B | Cistatina S | Calgranulina B | Cistatina SN | PIP | Ciclofillina A |

| | | | | | | |
|---------------------|--------------------|-------------|----------------|--------------|--------|---------------------------|
| vs | Anti-Ro/SSA | | | | | |
| Sclerodermia | Cistatina B | Cistatina D | Calgranulina B | Cistatina SN | actina | β -2 microglobulina |

| | | | | | | |
|---------------------|----------------------------------|--|---------|--------------|--|--|
| vs | Anti-Ro/SSA + Anti-La/SSB | | | | | |
| Sclerodermia | Cistatina B | | amilasi | Cistatina SN | | |

| | | | | | | |
|--------------------|----------------------------------|--|----------------------|--|----------------------|--|
| vs | Anti-Ro/SSA + Anti-La/SSB | | | | | |
| Anti-Ro/SSA | β -2 microglobulina | | Spot n° 68 (non id.) | | Spot n° 80 (non id.) | |

| | | | | | | |
|--------------------|----------------------------------|--|-------------|----------------|-----|--|
| vs | Sindrome secca idiopatica | | | | | |
| Anti-Ro/SSA | Calgranulina B | | Cistatina S | Calgranulina A | PIP | |

| | | | | | | |
|----------------------------------|----------------------------------|----------------------|----------------|---------------------|--|--|
| vs | Sindrome secca idiopatica | | | | | |
| Anti-Ro/SSA + Anti-La/SSB | amilasi | Spot n° 91 (non id.) | Calgranulina B | Spot n° 5 (non id.) | | |

L'analisi dei gel sintetici data l'alta stringenza dei gel stessi (100%) non permette di valutare in maniera effettiva variazioni qualitative o quantitative nell'espressione delle proteine dal momento

che sono automaticamente esclusi dal sintetico gli spot non condivisi da tutti i singoli gel di ciascun gruppo. Tuttavia essa ha consentito di restringere il campo d'analisi a 15 proteine la cui espressione sembra variare in maniera significativa nei gruppi.

IVb. ANALISI QUANTITATIVA DELLE PROTEINE DI INTERESSE

I dati preliminari hanno consentito di identificare 15 proteine espresse in maniera diversa nei gruppi in esame. Tali proteine sono elencate in Tabella 13 insieme all'analisi quantitativa della percentuale di volume ad esse relativa che è stata condotta misurando le singole percentuali di volume di ciascuno spot di interesse su ciascuno dei gel analitici di ogni gruppo e calcolandone media e deviazione standard.

Tabella 13. Media e deviazione standard della densità ottica delle proteine

| | Controllo sano | | SjS | | Sindrome secca | | Sclerodermia | | SSA | | SSA/SSB | |
|--------------------------|----------------|----------|----------|----------|----------------|----------|--------------|----------|---------|----------|---------|----------|
| | media | DS | media | DS | media | DS | media | DS | media | DS | media | DS |
| amilasi | 2.758571 | 1.049070 | 0.793333 | 0.434885 | 1.412000 | 0.598000 | 3.618000 | 3.120203 | 3.1067 | 2.301127 | 0.9500 | 0.532000 |
| PIP | 9.027143 | 3.641473 | 3.050000 | 2.033273 | 2.060000 | 2.738786 | 5.354000 | 1.742708 | 4.8433 | 1.836264 | 3.5680 | 3.801200 |
| albumina | 2.654286 | 0.627876 | 2.293000 | 2.016339 | 1.727500 | 0.991543 | 3.294000 | 1.229789 | 2.9140 | 1.200637 | 1.4260 | 0.800768 |
| cheratina 6L | 1.844000 | 0.510911 | 0.290000 | 0.485489 | 0.101000 | 0.174937 | 4.910000 | 1.307918 | 2.0325 | 1.607407 | 1.4125 | 1.984698 |
| actina | 0.661000 | 0.250000 | 1.340000 | 0.340000 | 1.236667 | 0.615911 | 0.690909 | 0.309207 | 0.99200 | 0.392173 | 0.9500 | 0.532466 |
| carbonato VI | 3.395714 | 1.375753 | 0.414000 | 0.625392 | 0.690000 | 0.283196 | 0.816000 | 0.578299 | 2.6025 | 2.244777 | 0.2260 | 0.311897 |
| cistatina SN | 4.764615 | 1.882947 | 1.419615 | 0.735749 | 0.967500 | 0.781340 | 6.127833 | 4.283895 | 2.3467 | 0.615169 | 3.4975 | 3.242452 |
| cistatina S | 2.086000 | 0.480240 | 0.735714 | 0.548266 | 0.462250 | 0.221447 | 1.501667 | 0.471950 | 1.2000 | 0.420535 | 0.3375 | 0.430842 |
| cistatina D | 0.734000 | 0.698000 | 0.527273 | 0.621741 | 0.517500 | 0.531311 | 1.640000 | 0.669925 | 0.7520 | 0.353935 | 1.1575 | 0.526712 |
| Imb. Elastasi leuc | 0.170000 | 0.020000 | 0.540000 | 0.110000 | 0.280000 | 0.226936 | 0.218333 | 0.094110 | 0.2470 | 0.40106 | 0.2840 | 0.240217 |
| lipocalina | 0.020000 | 0.056569 | 0.165000 | 0.110454 | 0.031667 | 0.077567 | nd | | nd | | nd | |
| ciclofillina A | nd | | 0.358000 | 0.110454 | 0.260000 | 0.109087 | 0.262857 | 0.089762 | 0.2467 | 0.064291 | 0.1800 | 0.17356 |
| calgranulina B | 0.091667 | 0.142887 | 2.442000 | 1.353706 | 1.890000 | 0.470957 | 3.302857 | 1.353067 | 1.7317 | 0.853379 | 2.6525 | 1.654476 |
| β 2 microglobulina | 0.580000 | 0.370135 | 1.793000 | 0.624000 | 0.887000 | 0.299070 | 1.112500 | 0.615090 | 0.5133 | 0.166693 | 1.08800 | 0.574000 |
| IgKc | 0.272000 | 0.177398 | 0.760000 | 0.214243 | 0.570000 | 0.203000 | 0.243333 | 0.230275 | 0.3645 | 0.194491 | 0.4400 | 0.229637 |

Il confronto delle medie della densità ottica nei gruppi è stato effettuato mediante test ANOVA e i risultati ottenuti sono riassunti in tabella 14.

Tabella 14. Test ANOVA per il confronto delle medie della densità ottica tra i gruppi

| | ANOVA su tutti i gruppi | Espressione nello SjS |
|---------------------------------|----------------------------|-----------------------|
| albumina | p=0,28 | invariata |
| amilasi | p=0,013 | ridotta |
| PIP | p=0,001 | ridotta |
| cheratina 6L | p=0,004 | ridotta |
| carbonato VI | p<0,0001 | ridotta |
| actina | p=0,001 | aumentata |
| cistatina SN | p<0,0001 | ridotta |
| cistatina S | p<0,0001 | ridotta |
| cistatina D | p=0,018 | ridotta |
| Inibitore elastasi leucocitaria | p<0,0001 | aumentato |
| lipocalina | p=0,003 | aumentata |
| ciclofillina A | p=? | aumentata |
| calgranulina B | p=0,001 | aumentata |
| β-2 microglobulina | p=0,0007 | aumentata |
| IgKc | p=0,0013 | aumentata |

Per chiarire il significato delle differenze osservate con il test ANOVA il confronto delle medie della densità ottica dei diversi spot rispetto alla SjS è stato effettuato mediante t-test di Student ed i risultati ottenuti sono riassunti in tabella 15.

Tabella 15. Risultati t-test confronto SjS verso controlli sani e patologici

| p- value (SjS vs..) | sano | sicca | sclero | SSA | SSA/SSB |
|------------------------|-------------------|--------------|-------------------|---------------|-------------|
| albumina | 0,65 | 0,60 | 0,33 | 0,54 | 0,37 |
| amilasi | 0,0002 | 0,06 | 0,01 | 0,01 | 0,82 |
| PIP | 0,0009 | 0,45 | 0,05 | 0,10 | 0,74 |
| cheratina 6L | 0,0011 | 0,40 | <0,0001 | 0,06 | 0,25 |
| carbonato VI | <0,0001 | 0,42 | 0,25 | 0,01 | 0,54 |
| actina | <0,0001 | 0,69 | 0,0027 | 0,01 | 0,01 |
| cistatina SN | <0,0001 | 0,30 | 0,001 | 0,06 | 0,03 |
| cistatina S | 0,0013 | 0,37 | 0,02 | 0,14 | 0,24 |
| cistatina D | 0,51 | 0,97 | 0,003 | 0,46 | 0,09 |
| Inib. Elastasi leuc | 0,0001 | 0,007 | 0,0001 | 0,03 | 0,01 |
| lipocalina | 0,0056 | 0,02 | nd | nd | nd |
| ciclofillina A | nd | 0,20 | 0,137 | 0,18 | 0,07 |
| calgranulina B | 0,002 | 0,46 | 0,30 | 0,31 | 0,83 |
| β-2 microglobulina | 0,0025 | 0,023 | 0,045 | 0,0004 | 0,06 |
| IgKc | 0,0019 | 0,15 | 0,0015 | 0,005 | 0,04 |

La tabella 16 illustra, infine, i risultati del confronto tra i vari gruppi e i controlli sani.

Tabella 16. Risultati di confronto dei gruppi patologici verso il gruppo di controllo dei soggetti sani ricavati con il t-test di Student

| p- value (sano vs..) | SjS | sicca | sclero | SSA | SSA/SSB |
|---------------------------|-------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| albumina | 0,65 | 0,08 | 0,26 | 0,63 | 0,06 |
| amilasi | 0,0002 | 0,03 | 0,50 | 0,72 | 0,05 |
| PIP | 0,0009 | 0,0049 | 0,06 | 0,03 | 0,01 |
| cheratina 6L | 0,0011 | 0,0014 | 0,001 | 0,33 | 0,42 |
| carbonato VI | <0,0001 | 0,0042 | 0,003 | 0,47 | 0,0005 |
| actina | <0,0001 | 0,023 | 0,8 | 0,06 | 0,18 |
| cistatina SN | <0,0001 | 0,0015 | 0,34 | 0,06 | 0,33 |
| cistatina S | 0,0013 | 0,0004 | 0,07 | 0,01 | 0,0008 |
| cistatina D | 0,51 | 0,59 | 0,03 | 0,95 | 0,31 |
| Inib. Elastasi leuc | 0,0001 | 0,11 | 0,11 | 0,11 | 0,12 |
| lipocalina | 0,0056 | 0,7 | nd | nd | nd |
| calgranulina B | 0,002 | 0,0001 | 0,0001 | 0,0009 | 0,005 |
| β -2 microglobulina | 0,002 | 0,22 | 0,11 | 0,69 | 0,13 |
| IgKc | 0,0019 | 0,03 | 0,82 | 0,43 | 0,25 |

V. DISCUSSIONE

I risultati ottenuti hanno permesso di mettere in evidenza numerose differenze tra il pattern proteico salivare dei pazienti con SjS ed i profili proteici salivari dei soggetti sani e dei controlli patologici.

In particolare nello studio sono state valutate le differenze relative all'espressione delle seguenti proteine salivari:

- proteine salivari acinari (albumina, α -amilasi salivare, PIP, cheratina 6L, anidrase carbonica VI).
- proteine infiammatorie e legate all'autoimmunità (calgranulina B, ciclofillina A, catena leggera κ delle immunoglobuline, beta2-microglobulina)
- proteine coinvolte nell'equilibrio proteasi / antiproteasi (cistatine D, S, SN e loro precursori, inibitore dell'elastasi leucocitaria)
- proteine coinvolte nel danno tissutale (actina, lipocalina-1 precursore)

Il profilo di espressione delle proteine salivari prodotte a livello acinare appare modificato nei pazienti con SjS rispetto ai controlli sani con una riduzione dell'intensità ottica dello spot principale dell'albumina e degli spot dell' α -amilasi salivare, della PIP, della cheratina 6L e della carbonato anidrase VI. E' possibile osservare una riduzione dell'espressione delle suddette proteine acinari (seppure ai limiti della significatività statistica) anche nei profili proteici salivari dei controlli patologici, secondo un gradiente che avvicina i pazienti con SjS a quelli con sindrome sicca idiopatica e ai soggetti asintomatici con anticorpi anti-RoSSA/+ anti-La/SSB e, viceversa, i controlli sani ai soggetti affetti da sclerodermia e ai portatori asintomatici di anti-Ro/SSA. I dati ottenuti sono in linea con gli studi della letteratura che documentano nella saliva dei pazienti con SjS una riduzione dell' α -amilasi salivare e della carbonato deidrogenasi VI (81). Le ipotesi proposte per giustificare la ridotta espressione delle proteine suddette sono fondamentalmente quelle della frammentazione proteica aumentata e quella di una ridotta produzione da danno acinare. La prima ipotesi può giustificare in maniera relativamente lineare la riduzione dello spot principale dell'albumina nei pazienti con SjS: quando esso viene sommato ai frammenti di albumina identificati alla spettrometria di massa, la densità degli spot totali dell'albumina non risulta statisticamente differente nel confronto tra i pazienti con SjS e tutti gli altri gruppi in studio. Anche la riduzione della PIP potrebbe essere correlata sia ad una ridotta

produzione che allo stato di infiammazione subclinica cronica del cavo orale dal momento che nel confronto con i controlli sani essa si riduce in particolare nei soggetti con SjS e con sindrome secca. La PIP è, infatti, una proteina di secrezione presente nella saliva in forma glicosilata e non glicosilata la cui funzione seppure in larga parte ancora da chiarire, sembra essere quella di legarsi ad altre proteine come il fibrinogeno, l'actina, la cheratina, la miosina e la tropomiosina. La PIP si lega anche all'idrossiapatite, componente principale della pellicola dei denti e sembra capace di legarsi ai batteri del cavo orale svolgendo un ruolo potenziale nell'immunità innata e nella difesa delle mucose (104). La riduzione della PIP che è stata evidenziata potrebbe, pertanto, essere analoga a quella della PIP lacrimale descritta nei pazienti con blefarite cronica. Altre due proteine ricche in prolina, che si riducono nei controlli patologici sono l' α -amilasi salivare e la carbonato deidrogenasi VI, la prima è un'idrolasi coinvolta nella digestione buccale dell'amido, la seconda nell'idratazione reversibile del diossido di carbonio e, di conseguenza, nel mantenimento dell'omeostasi del pH salivare. La riduzione della carbonato deidrogenasi è probabilmente la più eclatante al punto che gli spots (es.n° 26-29) che l'identificano sono addirittura mancanti nel gel sintetico dei soggetti con SjS. Il risultato può giustificare anche la tendenza del pH salivare dei pazienti con SjS ad essere complessivamente più basso (pH 6.75 ± 0.41) che nei controlli sani (pH 7.00 ± 0.48). Nel dettaglio nei gel dei soggetti sani è stato possibile identificare tre diversi spots per la carbonato deidrogenasi VI, probabilmente correlabili a isoforme dell'enzima, mentre nei singoli gel dei pazienti con SjS è stato possibile documentarne o una marcata riduzione o addirittura la non espressione. Questo dato è in linea con quanto recentemente pubblicato in letteratura in cui è stata documentata una riduzione dell'espressione del gene della carbonato deidratasi VI nelle ghiandole salivari minori dei pazienti con SjS (105). Una riduzione della carbonato deidrogenasi VI è in realtà evidenziabile anche nei soggetti con sindrome secca, con sclerodermia e nei portatori asintomatici di anti-Ro/SSA+ anti-La/SSB, mentre i valori di densità dei portatori degli anti-Ro/SSA sono sovrapponibili ai controlli sani. Infine, sempre nell'ambito dell'espressione delle proteine acinari, lo studio ha permesso di documentare una riduzione nell'espressione della cheratina 6L nei soggetti con SjS e sindrome secca ed uno spiccato aumento della stessa nei pazienti con Sclerodermia ($p < 0,0001$), verosimilmente in relazione al processo fibrotico che caratterizza la malattia. Complessivamente, con l'eccezione della cheratina, relativamente all'espressione delle proteine acinari si conferma quindi lo spettro di riduzione che ha ai due estremi i gel dei pazienti con SjS e i controlli sani. I soggetti con sindrome secca idiopatica e quelli con

anticorpi anti-Ro/SSA+ anti-La/SSB sono più simili ai pazienti con SjS, i pazienti con sclerodermia e quelli con anti-Ro/SSA ai controlli sani.

Accanto alle modificazioni nei livelli di espressione delle proteine salivari tipiche, il pattern proteico salivare dei pazienti con SjS presenta una combinazione di proteine pro-infiammatorie e legate al sistema immunitario. In realtà, proteine infiammatorie come la calgranulina B e la ciclofillina A, sono espresse in maniera aumentata, e non significativamente diversa che nello SjS, anche nei profili salivari dei pazienti con sindrome secca, sclerodermia e autoanticorpi anti-Ro/SSA e anti-Ro/SSA + anti La/SSB. assumendo quindi un significato aspecifico. La ciclofillina A è il prototipo di una famiglia di proteine altamente conservate, coinvolte in molti processi biologici come l'espressione, l'assemblamento e la degradazione delle proteine. Nell'ambito dei processi di flogosi la ciclofillina A sembra agire con meccanismo autocrino e paracrino, come attivatore delle cellule endoteliali contribuendo all'attivazione immuno-mediata e alla disfunzione endoteliale. La calgranulina B, invece, appartiene alla famiglia S100 delle proteine leganti il calcio ed è noto che viene espressa sia nei processi di flogosi acuta che nei processi di flogosi cronica. A differenza della calgranulina B e della ciclofillina A, i pazienti con SjS presentano un aumento statisticamente significativo, rispetto agli altri gruppi di pazienti, della beta-2 microglobulina e dell'espressione della catena leggera κ delle immunoglobuline. Questo risultato, può riflettere l'attivazione policlonale, sistemica e salivare, dei linfociti B nella sindrome di SjS e conferma, anche in questo caso, precedenti osservazioni della letteratura (40, 81).

Un ulteriore elemento peculiare del pattern salivare dei pazienti con SjS presente solo nei soggetti con sindrome secca idiopatica e non nei controlli sani nè nei pazienti con sclerodermia anti-Ro/SSA e anti-Ro/SSA + anti-La/SSB, concerne l'alterazione del bilancio tra proteasi e anti-proteasi salivari. Il dato più rilevante è a carico delle cistatine, S e SN. Le cistatine sono proteine inibitrici delle cistein-proteinasi che svolgono il ruolo di proteggere i tessuti da un'attivazione di sregolata delle proteinasi stesse. Le cistatine sono espresse in una ampia varietà di isoforme che possono differenziarsi per il grado di fosforilazione e/o glicosilazione. Nello studio la loro marcata riduzione può riflettere un consumo da parte delle proteasi considerando la variazione consensuale nella SjS e nelle sindromi sicche idiopatiche della cistatina SN e della S. La cistatina D non sembra presentare modificazioni significative nei pazienti con SJS rispetto ai controlli sani e agli altri gruppi patologici, con l'eccezione della Sclerodermia nella quale i livelli di cistatina D sembrano essere aumentati. Nell'ambito delle alterazioni presentate dal sistema degli

inibitori delle proteasi si osserva, inoltre, in modo peculiare nei pazienti con SjS, un aumento nei livelli di espressione di altre proteine inibitrici di proteasi salivari come la proteina inibitrice dell'elastasi leucocitaria. Questa proteina appartiene alla famiglia delle proteine inibitrici delle serin-proteasi e regola in primis l'attività delle proteasi dei neutrofili /elastasi, catepsina G e proteinasi 3. Il significato ultimo dello squilibrio osservato e la preponderante espressione delle proteine inibitrici le serin-proteasi sulle cistein-proteasi rimane in larga parte da chiarire.

Infine, in generale, nella saliva dei pazienti con SjS si osserva un'ampia espressione di proteine coinvolte nel danno tissutale sia come effettori del danno che come fattori di protezione nei confronti del danno tissutale stesso. Tra esse è stato possibile osservare, nello studio, l'aumento dell'actina e della lipocalina-1. L'actina aumenta in maniera statisticamente significativa nei pazienti con SjS e con sindrome sicca idiopatica mentre la lipocalina-1 solo nei pazienti con SjS. L'actina è una proteina del citoscheletro contenuta in tutti gli elementi cellulari. Un aumento della concentrazione salivare dell'actina è descritto anche nei pazienti con mucositi correlate a radioterapia per neoplasie del cavo orale ed è quindi considerato come marker aspecifico di danno del cavo orale. La lipocalina-1 è, invece, una proteina che agisce come scavenger fisiologico delle molecole che derivano dalla per ossidazione lipidica ma anche come inibitore delle serin-proteasi. Il suo aumento significativo nella saliva dei pazienti con SjS rimane ancora da chiarire ed appare particolarmente interessante considerando che recentemente la lipocalina-1 è stata identificata come potenziale autoantigene nelle lacrime dei pazienti affetti da SjS (106).

VI. CONCLUSIONI

Questo studio ha permesso di caratterizzare mediante analisi proteomica il profilo proteico della saliva dei pazienti con SjS confrontando il pattern ottenuto non solo con quello dei controlli sani ma anche rispetto ai diversi pattern di un gruppo eterogeneo di controlli patologici: pazienti con flogosi cronica del cavo orale ad eziologia non immune, pazienti con malattia autoimmune sistemica e pazienti con profilo autoanticorpale patologico analogo a quello dei pazienti con sindrome di Sjogren ma asintomatici per quanto relativo alla secchezza orale e oculare. I risultati ottenuti, seppure preliminari, hanno mostrato come il profilo proteico salivare dei pazienti con SjS risulti estremamente complesso e presenti aspetti peculiari che in parte riflettono l'impegno flogistico selettivo da parte della malattia delle ghiandole salivari, in parte riflettono le alterazioni del microambiente orale che essa induce e in parte, infine, la natura autoimmune sistemica della SjS. L'analisi a confronto delle modificazioni subite dal pattern proteico salivare normale, nella SjS e nelle altre diverse situazioni patologiche, ha permesso di focalizzare l'attenzione, in particolare, su 15 proteine (albumina, amilasi, proteina inducibile la prolattina, cheratina 6 L, carbonato deidrogenasi VI, cistatina SN, S, D, inibitore dell'elastasi leucocitaria, actina, lipocalina, ciclofillana A, calgranulina B, beta-2-microglobulina e catena leggera kappa delle Ig) e di speculare sull'eziopatogenesi delle modificazioni osservate.

Complessivamente nella SjS si osserva una marcata riduzione delle proteine a secrezione acinare (albumina, amilasi, proteina inducibile la prolattina, cheratina 6 L, carbonato deidrogenasi VI), una riduzione delle cistatine ed un incremento delle proteine inibitrici delle serin proteasi, un aumento delle proteine infiammatorie e delle proteine legate al danno tissutale (actina) ma soprattutto, in maniera specifica, un incremento nell'espressione della beta-2-microglobulina e della catena leggera kappa delle immunoglobuline, riconducibili all'attivazione B cellulare a livello ghiandolare ed un incremento della lipocalina, proteina scavenger, sospettata di svolgere ruolo di autoantigene a livello lacrimale. L'insieme delle alterazioni osservate suggerisce che il dosaggio dei livelli salivari di un numero limitato di proteine, identificate tramite analisi proteomica, possa costituire un valido ausilio nella diagnosi di malattia, configurando una sorta di algoritmo proteico da applicare soprattutto nei casi che rimangono dubbi nelle indagini di diagnostica tradizionale. In conclusione, quindi, seppure a livello preliminare, lo studio ha mostrato come l'analisi proteomica di fluidi biologici, scarsamente complessi

e facilmente reperibili come la saliva, possa rappresentare un'arma utile ed efficace nella diagnosi delle malattie reumatiche, in generale, e della SjS in particolare.

VII. BIBLIOGRAFIA

1. Ramos-Casals M., Tzioufas AG., Font J. Primary Sjogren's syndrome: new clinical and therapeutic concepts. *Ann Rheum Dis* 2005; 64: 347-354
2. Fox RJ. Sjogren's Syndrome. *Lancet* 2005; 366:321-331
3. Thomas E., Hay EM., Hajeer A., Silman AJ. Sjogren's syndrome: a community-based study of prevalence and impact. *Br J Rheumatol* 1998; 37: 1069-1076
4. Pillemer SR., Matteson EL., Jacobsson LT. Incidence of Physician-diagnosed primary Sjogren's syndrome in residents of Olmsted County, Minnesota. *Mayo Clin Proc* 2001; 76; 593-99
5. Bowman SJ., Ibrahim GH., Holmes G., Hamburger J., Ainsworth JR. Estimating the prevalence among Caucasian women of primary Sjogren's syndrome in two general practises in Birmingham, UK. *Scand J Rheumatol* 2004; 33:39-43
6. Trontzas PI., Andrianakos AA. Sjogren's syndrome: a population based study of prevalence in Greece. The ESORDIG study. *Ann Rheum Dis* 2005; 64: 1240-1241
7. Vitali C., Bombardieri S., Jonsson R., Moutsopoulos HM., Alexander EL, Carson SE., et al. Classification Criteria for Sjogren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. *Ann Rheum Dis* 2002; 61:554-8
8. Theander E., Manthorpe R., Jacobsson THL. Mortality and causes of death in primary Sjogren's syndrome. A Prospective cohort study. *Arthritis Rheum* 2004; 50:1262-1269
9. Arnett F. Histocompatibility typing in the rheumatic diseases: diagnostic and prognostic implications. *Med Clin North Am* 1994; 20: 371-87
10. Delaleu N, Jonsson R., Koller MM. Sjogren's syndrome. *Eur J Oral Sci* 2005; 113:101-113
11. Triantafyllopoulou A., Moutsopoulos HM. Autoimmunity and Coxsackievirus Infection in Primary Sjögren's Syndrome. *Ann N.Y. Acad Sci* 2005; 1050: 389–396
12. Skopouli FN., Moutsopoulos HM. Autoimmune epithelitis : Sjogren's syndrome. *Clin Exp Rheumatol*1994 ; 12(S11): 9-11
13. Mitsias DI, Tzioufas AG, Veiopoulou C, et al.: The Th1/Th2 cytokine balance changes with the progress of the immunopathological lesion of Sjögren's syndrome. *Clin Exp Immunol* 2002, 128:562–568.
14. Ogawa N., Ping L., Zhenjun L., Takada Y., Sugai S. Involvement of the interferon-gamma-induced T cell-attracting chemokines, interferon-gamma-inducible 10-kd protein

- (CXCL10) and monokine induced by interferon-gamma (CXCL9), in the salivary gland lesions of patients with Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 2002; 46:2730-41
15. Salomonsson S., Larsson P., Tengner P., Mellquist E., Hjelmstrom P., Wahren-Herlenius M. Expression of the B cell-attracting chemokine CXCL13 in the target organ and autoantibody production in ectopic lymphoid tissue in the chronic inflammatory disease Sjogren's syndrome. *Scand J Immunol.* 2002;55:336-42.
16. Youinou P., Daridon C., Saraux A., Devauchelle V., Pers JO. Is B-cell the conductor of the lymphocyte orchestra in the salivary glands of patients with primary Sjögren's syndrome. *Clin Exp Rheumatol* 2006; 24: 491-492.
17. Bolstad AI., Eiken HG., Rosenlund B., et al.: Increased salivary gland tissue expression of Fas, Fas ligand, cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4, and programmed cell death 1 in primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 2003; 48:174–185.
18. Fox RI., Stern M.: Sjögren's syndrome: mechanisms of pathogenesis involve interaction of immune and neurosecretory systems. *Scand J Rheumatol* 2002; 116:3–13.
19. Beroukas D., Hiscock J., Gannon BJ., et al.: Selective down-regulation of aquaporin-1 in salivary glands in primary Sjögren's syndrome. *Lab Invest* 2002; 82:1547–1552.
20. Hansen A., Lipsky PE., Dorner T. New concepts in the pathogenesis of Sjögren syndrome: many questions, fewer answers. *Curr Opin Rheumatol* 2003; 15:563–570
21. Dawson LJ., Stanbury J., Venn N., Hasdimir B., Rogers SN., Smith PM. Antimuscarinic Antibodies in Primary Sjögren's Syndrome Reversibly Inhibit the Mechanism of Fluid Secretion by Human Submandibular Salivary Acinar Cells. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 1165–1173
22. Skopouli FN., Dafni U., Ioannidis JP., Moutsopoulos HM. Clinical evolution, and morbidity and mortality of primary Sjogren's syndrome. *Semin Arthritis Rheum* 2000; 29:296-304
23. Rolando M. Sjogren's syndrome as seen by an ophthalmologist. *Scand J Rheumatol* 2001; S115: 27-33
24. Soto-Rojas AE., Kraus A. The oral side of Sjogren's syndrome. Diagnosis and treatment. A Review. *Arch Med Research* 2002; 33:95-106
25. Hamburger J. Sjogren's syndrome as seen by an oral physician. *Scand J Rheumatol* 2001; S115: 34-39
26. Ramos-Casals M., Font J., Garcia-Carrasco M., Brito MP., Rosas J., Calvo-Alen J et al. Primary Sjogren syndrome: hematologic patterns of disease expression. *Medicine (Baltimore)* 2002; 81: 281-292

27. Tsioufas AG., Boumba DS., Skopouli FN., Moutsopoulos HM. Mixed monoclonal cryoglobulinemia and monoclonal rheumatoid factor cross-reactive idiotypes as predictive factors for the development of lymphoma in primary Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1996; 39: 767-772
28. Voulgarelis M., Dafni UG., Isenberg DA., Moutsopoulos HM. Malignant lymphoma in primary Sjogren's syndrome: a multicenter, retrospective, clinical study by the European Concerted Action on Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1999; 42: 1765-1772
29. Baldini C., Tavoni A., Merlini G., Sebastiani M., Bombardieri S. Sindrome di Sjogren primitiva: descrizione clinica e sierologica di una casistica monocentrica. *Reumatismo*, 2005; 57(4):256-261
30. Praprotnik S., Bozic B., Kveder T., Rozman B. Fluctuation of anti-Ro/SSA antibody levels in patients with systemic lupus erythematosus and Sjogren's syndrome: a prospective study. *Clin Exp Rheumatol* 1999; 17:63-68
31. Loch H, Pelck R., Manthorpe R. Clinical manifestations correlated to the prevalence of autoantibodies in a large cohort of patients with primary Sjogren's syndrome. A comparison of patients initially diagnosed according to the Copenhagen classification criteria with the American-European consensus criteria. *Autoimmun Rev* 2005; 4:276-281
32. Meyer O. Anti-SSA/Ro and anti-SSB/La antibodies. What's new? *Ann Med Interne (Paris)*. 2002;153:520-9
33. Ulbricht KU., Schmidt RE., Witte T. Antibodies against alpha-fodrin in Sjogren's syndrome. *Autoimmun Rev* 2003; 2: 109-113
34. Vitali C, Bombardieri S., Moutsopoulos HM., Balestrieri G., Bencivelli W., Bernstein RM., Bjerrum KB., Braga S., Coll J., de Vita S., et al. Preliminary criteria for the classification of Sjogren's syndrome. Results of a prospective concerted action supported by the European Community. *Arthritis Rheum* 1993; 36:340- 347.
35. Vitali C., Moutsopoulos HM., Bombardieri S. The European Community Study Group on diagnostic criteria for Sjogren's syndrome. Sensitivity and specificity of tests for ocular and oral involvement in Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 1994; 53: 637-647
36. Vivino FB., Gala I. Hermann GA. Change in Final Diagnosis on Second Evaluation of Labial Minor Salivary Gland Biopsies. *J. Rheumatol* 2002; 29: 938-944
37. Greenspan JS, Daniels TE, Talal N, Sylvester RA. The histopathology of Sjogren's syndrome in labial salivary gland biopsies. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1974; 37: 217-229

38. Daniels TE. Labial salivary gland biopsy in Sjogren's syndrome. Assessment as a diagnostic criterion in 362 suspected cases. *Arthritis Rheum* 1984; 27:147-156
39. Pijpe J., Kalk WWI., Bootsma H., Spijkervet FKL., Kallenberg CGM., Vissink A. Progression of salivary gland dysfunction in patients with Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 2007;66: 107-112
40. Stuchell RN., Mandel ID., Baumhart H. Clinical utilization of sialochemistry in Sjogren's syndrome. [J Oral Pathol](#). 1984;13:303-309
41. Cuida M., Halse AK., Johannessen AC., Tynning T., Jonsson R. Indicators of salivary gland inflammation in primary Sjogren's syndrome. *Eur J Oral Sci*. 1997;105:228-33.
42. van der Reijden WA., van der Kwaak JS., Veerman EC., Nieuw Amerongen AV. Analysis of the concentration and output of whole salivary constituents in patients with Sjogren's syndrome. *Eur J Oral Sci*. 1996;104: 335-340
43. Moutsopoulos HM, Karsh J, Wolf RO, Tarpley TM, Tylden A, Papadopoulos NM. Lysozyme determination in parotid saliva from patients with Sjogren's syndrome. *Am J Med* 1980; 69:39-42
44. Jezequel N., Depasse F., Jouquan J., Lelong A., Roncin S., Pare G., Pennec YL., Youinou P. Salivary lactoferrin in primary Sjogren's syndrome. *Clin Exp Rheumatol*. 1989;7:123-5
45. Sreebny L., Zhu WX. Whole saliva and the diagnosis of Sjogren's syndrome: an evaluation of patients who complain of dry mouth and dry eyes. Part 1: Screening tests. *Gerodontology*. 1996;13:35-43
46. Wu AJ, Lafrenie RM, Park C et al. Modulation of MMP-2 (gelatinase A) and MMP-9 (gelatinase B) by interferon-gamma in a human salivary gland cell line. *J Cell Physiol* 1997;171:117-24.
47. Hernandez CC, Donadi EA, Reis ML. Kininogen-kallikrein-kinin system in plasma and saliva of patients with Sjogren's syndrome. *J Rheumatol* 1998;25:2381-4.
48. Kalk WWI., Vissink A., Stegenga B., Bootsma H., Nieuw Amerongen AV., Kallenberg CGM. Sialometry approach for diagnosing Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 2002;61;137-144
49. Choudhary J., Grant SGN. Proteomics in postgenomic neuroscience: the end of the beginning. *Nature Neuroscience* 2004; 5: 440-445.
50. Godovac-Zimmermann J., Soskic V., Poznanovic S., Brianza F. Functional proteomics of signal transduction by membrane receptors. *Electrophoresis* 1999; 20: 952-961.

51. Imam-Sghiouar N., Laude-Lemaire I., Labas V., Pflieger D., Le Caer JP., Caron M., Nabias DK., Joubert-Caron R. Subproteomics analysis of phosphorylated proteins: application to the study of B-lymphoblast from a patient with Scott syndrome. *Proteomics* 2002; 2: 828-838.
52. Graves PR., Haystead ATJ. *Molecular Biologist's Guide to Proteomics Microbiology and Molecular Biol Rev* 2002; 66: 39-63
53. Pandey A., Mann M. Proteomics to study genes and genomes. *Nature* 2000; 405: 837-846.
54. Phizicky E., Bastiaens PI., Zhu H., Snyder M., Fields S. Protein analysis on a proteomic scale. *Nature* 2003; 422: 208-215.
55. Berkelman T., Stenstedt T. 2-D Electrophoresis, using immobilized pH gradients. *Principles and Methods*. Amersham Biosciences 2002; 17-22.
56. Klose J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutation in mammals. *Humangenetik* 1975; 26: 231-243.
57. Gorg A., Postel W., Gunther S., Weser J. Improved horizontal two-dimensional electrophoresis with hybrid isoelectric focusing in immobilized pH gradients in the first dimension and laying-on transfer to the second dimension. *Electrophoresis* 1985; 6: 599-604.
58. Sanchez JC., Rouge V., Pisteur M., Ravier F., Tonella L., Moosmayer M., Wilkins MR., Hochstrasser DF. "Improved and simplified in-gel sample application using reswelling of dry immobilized pH gradients". *Electrophoresis* 1997; 18: 324-327.
59. Candiano G., Bruschi M., Musante L., Santucci L., Ghiggeri GM., Carnemolla B., Orecchia P., Zardi L., Righetti PG. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis* 2004; 25: 1327-1333.
60. Wilkins MR., Williams KL., Appeal RD., Hochstrasser DF. *Proteome research: new frontiers in functional genomics*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg 1997; 1-12.
61. Godovac-Zimmermann J., Brown L. *Perspectives for Functional Proteomics and Mass Spectrometry*. *Mass. Spec. Reviews*, 2001, 20: 1-57
62. Aebersold R., Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 2003; 422: 198-207
63. Fusaro VA., Stone JH. Mass spectrometry-based proteomics and analyses of serum: a primer for the clinical investigator. *Clin Exp Rheumatol*. 2003; 21(S32):S3-14

64. Westermier R., Loland S., Asbury R. La tecnologia proteomica. *Journal of Clinical ligand assay*. 2002. 25: 250-260
65. Bonk T., Humeny A. MALDI-TOF-MS Analysis of Protein and DNA. *The Neuroscientist* 2001; 1: 6-12
66. Langen H., Berndt P., Roder D., Cairns N., Lubec G., Fountoulakis M. Two-dimensional map of human brain proteins". *Electrophoresis* 1999; 20: 907-916.
67. Husi H., Grant SGN. Proteomics of the nervous system. *Trends in Neurosciences* 2001; 5: 259-266
68. Humphrey SP., Williamson RT. A review of saliva: Normal composition, flow, and function. *The journal of prosthetic dentistry* 2001; 85: 162-169.
69. Amado FML., Vitorino RMP., Domingues PMDN., Lobo MJC., Duarte JAR. Analysis of the human saliva proteome. *Expert Rev Proteomics* 2005; 2:521-539
70. Kaufman E., Lamster IB. The diagnostic application of saliva-a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002; 13: 197-212.
71. Drake RR., Cazare LH., Semmes OJ., Wadsworth JT. Serum, salivary and tissue proteomics for discovery of biomarkers for head and neck cancers. *Expert Rev Mol Diagn.* 2005;5:93-100.
72. Huang CM. Comparative proteomic analysis of human whole saliva. *Arch Oral Biol* 2004; 49: 951-962
73. Vitorino R., Lobo M. J., Ferrer-Correira A. J., Dubin, J. R., Tomer K. B., Domingues, P. M., Amado F. M. Identification of human whole saliva protein components using proteomics. *Proteomics* 2004; 4: 1109 -1115
74. Hirtz C., Chevalier F., Centeno D., Egea JC., Rossignol M., Sommerer N., de Périère D. Complexity of the human whole saliva proteome. *J Physiol Biochem* 2005; 61: 469-480
75. Yao Y., Berg EA., Costello CE., Troxler RF, Oppenheim FG Identification of Protein Components in Human Acquired Enamel Pellicle and Whole Saliva Using Novel Proteomics Approaches 2003; 278: 5300-5308
76. Kojima T., Andersen E., Sanchez J. C., Wilkins M. R., Hochstrasser D. F., Pralong W. F., Cimasoni G. Human gingival crevicular fluid contains MRP8 (S100A8) and MRP14 (S100A9), two calcium-binding proteins of the S100 family. *J Dent. Res.* 2000; 79: 740-747.
77. Hardt M, Thomas LR., Dixon SE., Newport G., Agabian N., Prakobphol A., Hall SC., Witkowska HE., Fisher SJ. Toward Defining the Human Parotid Gland Salivary Proteome

- and Peptidome Identification and Characterization Using 2D SDS-PAGE, Ultrafiltration, HPLC and Mass Spectrometry. *Biochemistry* 2005; 44: 2885-2899
78. Hu S., Denny P., Xie Y., Loo JA., Wolinsky LE., Li Y., McBride J., Ogorzalek Loo RR., Navazesh M., Wong DT. Differentially expressed protein markers in human submandibular and sublingual secretions. *Int J Oncol* 2004; 25:1423-30.
79. Yang LL., Liu XQ., Liu W., Cheng B., Li MT. Comparative analysis of whole saliva proteomes for the screening of biomarkers for oral lichen planus. *Inflamm Res* 2006; 55:405-7
80. Wong DT. Salivary diagnostics for oral cancer. *J Calif Dent Assoc* 2006;34:303-8
81. Ryu OH., Atkinson JC., Hoehn GT., Illei GG., Hart TC. Identification of parotid salivary biomarkers in Sjogren's syndrome by surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and two-dimensional difference gel electrophoresis. *Rheumatology (Oxford)* 2006;45:1077-86.
82. Hermansson M., Sawaji Y., Bolton M., Alexander S., Wallace A., Begum S., Wait R., Saklatvala J. Proteomic analysis of articular cartilage shows increased type II collagen synthesis in osteoarthritis and expression of inhibin betaA (activin A), a regulatory molecule for chondrocytes. *J Biol Chem* 2004; 279:43514-21
83. De Ceuninck F., Marcheteau E., Berger S., Caliez A., Dumont V., Raes M., Anract P., Leclerc G., Boutin JA., Ferry G. Assessment of some tools for the characterization of the human osteoarthritic cartilage proteome. *J Biomol Tech* 2005;16: 256-65.
84. Ruiz-Romero C., Lopez-Armada MJ., Blanco FJ. Proteomic characterization of human normal articular chondrocytes: a novel tool for the study of osteoarthritis and other rheumatic diseases. *Proteomics* 2005;5:3048-59.
85. Sinz A., Bantscheff M., Mikkat S., Ringel B., Drynda S., Kekow J., Thiesen HJ, Glocker MO. Mass spectrometric proteome analyses of synovial fluids and plasmas from patients suffering from rheumatoid arthritis and comparison to reactive arthritis or osteoarthritis. *Electrophoresis* 2002; 23:3445-56
86. Liao H., Wu J., Kuhn E., Chin W., Chang B, Jones MD., O'Neil S., Clauser KR., Karl J., Hasler F., Roubenoff R., Zolg W., Guild BC. Use of mass spectrometry to identify protein biomarkers of disease severity in the synovial fluid and serum of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2004;50:3792-803
87. Drynda S., Ringel B., Kekow M., Kuhne C., Drynda A., Glocker MO., Thiesen HJ., Kekow J. Proteome analysis reveals disease-associated marker proteins to differentiate RA

- patients from other inflammatory joint diseases with the potential to monitor anti-TNFalpha therapy. *Pathol Res Pract* 2004;200:165-71
88. de Seny D., Fillet M., Meuwis MA., Geurts P., Lutteri L., Ribbens C., Bours V., Wehenkel L., Piette J., Malaise M., Merville MP. Discovery of new rheumatoid arthritis biomarkers using the surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry ProteinChip approach. *Arthritis Rheum* 2005; 52:3801-12
89. An Y., Pu H., He SZ., Li ZG. Identification of biomarkers in serum of early rheumatoid arthritis by proteomic methods *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2005;85:1261-5
90. Tilleman K., Van Beneden K., Dhondt A., Hoffman I., De Keyser F., Veys E., Elewaut D., Deforce D. Chronically inflamed synovium from spondyloarthropathy and rheumatoid arthritis investigated by protein expression profiling followed by tandem mass spectrometry. *Proteomics*. 2005; 5:2247-57
91. Miyamae T., Malehorn DE., Lemster B., Mori M., Imagawa T., Yokota S., Bigbee WL., Welsh M., Klarskov K., Nishimoto N, Vallejo AN., Hirsch R. Serum protein profile in systemic-onset juvenile idiopathic arthritis differentiates response versus nonresponse to therapy. *Arthritis Res Ther* 2005;7:R746-55.
92. Tomosugi N., Kitagawa K., Takahashi N., Sugai S., Ishikawa I. Diagnostic potential of tear proteomic patterns in Sjogren's syndrome. *J Proteome Res* 2005;4:820-5.
93. Stone JH., Rajapakse VN., Hoffman GS., Specks U., Merkel PA., Spiera RF., Davis JC., St Clair EW., McCune J., Ross S., Hitt BA., Veenstra TD., Conrads TP., Liotta LA., Petricoin EF 3rd; Wegener's Granulomatosis Etanercept Trial Research Group. A serum proteomic approach to gauging the state of remission in Wegener's granulomatosis. *Arthritis Rheum* 2005;52:902-910.
94. Fietta A., Bardoni A., Salvini R., Passadore I., Morosini M., Cavagna L., Codullo V., Pozzi E., Meloni F., Montecucco C. Analysis of bronchoalveolar lavage fluid proteome from systemic sclerosis patients with or without functional, clinical and radiological signs of lung fibrosis. *Arthritis Res Ther*. 2006; 8:R160
95. Atzeni F., Bardoni A., Cutolo M., Hunzelmann N., Krieg T., Martini G., Montecucco C., Olski TM., Secchi ME., Valentini G., Zulian F., Sarzi-Puttini P. Localized and systemic forms of scleroderma in adults and children. *Clin Exp Rheumatol* 2006; 24 (S 40):S36-45
96. Denton CP., Black CM., Abraham DJ. Mechanisms and consequences of fibrosis in systemic sclerosis. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2006; 2:134-144
97. Hummers LK. Microvascular damage in systemic sclerosis: detection and monitoring with biomarkers. *Curr Rheumatol Rep* 2006;8:131-137

98. Mason GI., Hamburger J., Matthews JB. Mast cells, extracellular matrix components, TGF β isoforms and TGF β receptor expression in labial salivary glands in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2000; 59:183-189
99. Chisolm DM et al. Labial salivary gland biopsy in Sjogren's syndrome. *Clin Pathol* 1968; 21:656-60
100. Subcommittee for Scleroderma Criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and therapeutic Criteria Committee. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum* 1980; 23: 581-590
101. Peterson GL. Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. *Anal Biochem* 1979; 100: 201-220
102. Baldini C., Giusti L., Bazzichi L., Lucacchini A., Ciregia F., Tavoni A., Bombardieri S.. Analisi Proteomica della saliva nei pazienti con Sindrome di Sjogren primitiva. *Reumatismo* 2006, 58(3)
103. Giusti L, Baldini C, Bazzichi L., Ciregia F., Tonazzini I., Mascia G., Giannaccini G., Bombardieri S., Lucacchini A. Siena Proteomics Proceedings. Proteome analysis of whole saliva: a new tool for rheumatic diseases - the example of Sjögren's syndrome. in press
104. Mirels L., Hand AR., Branin HJ. *J Histochem Cytochem* 1998; 46: 1061-1071
105. Kivela J., Parkkila S., Parkkila AK., Leinonen J., Rajaniemi H. Salivary carbonic anhydrase isoenzyme Vi. *J Physiol* 1999; 520: 315-320
106. Navone R., Lunardi C., Gerli R., Tinazzi E., Peterlana D., Bason C., Corrocher R., Puccetti A. Identification of tear lipocalin as a novel autoantigen target in Sjogren's syndrome. *J Autoimmun* 2005; 25: 229-234.

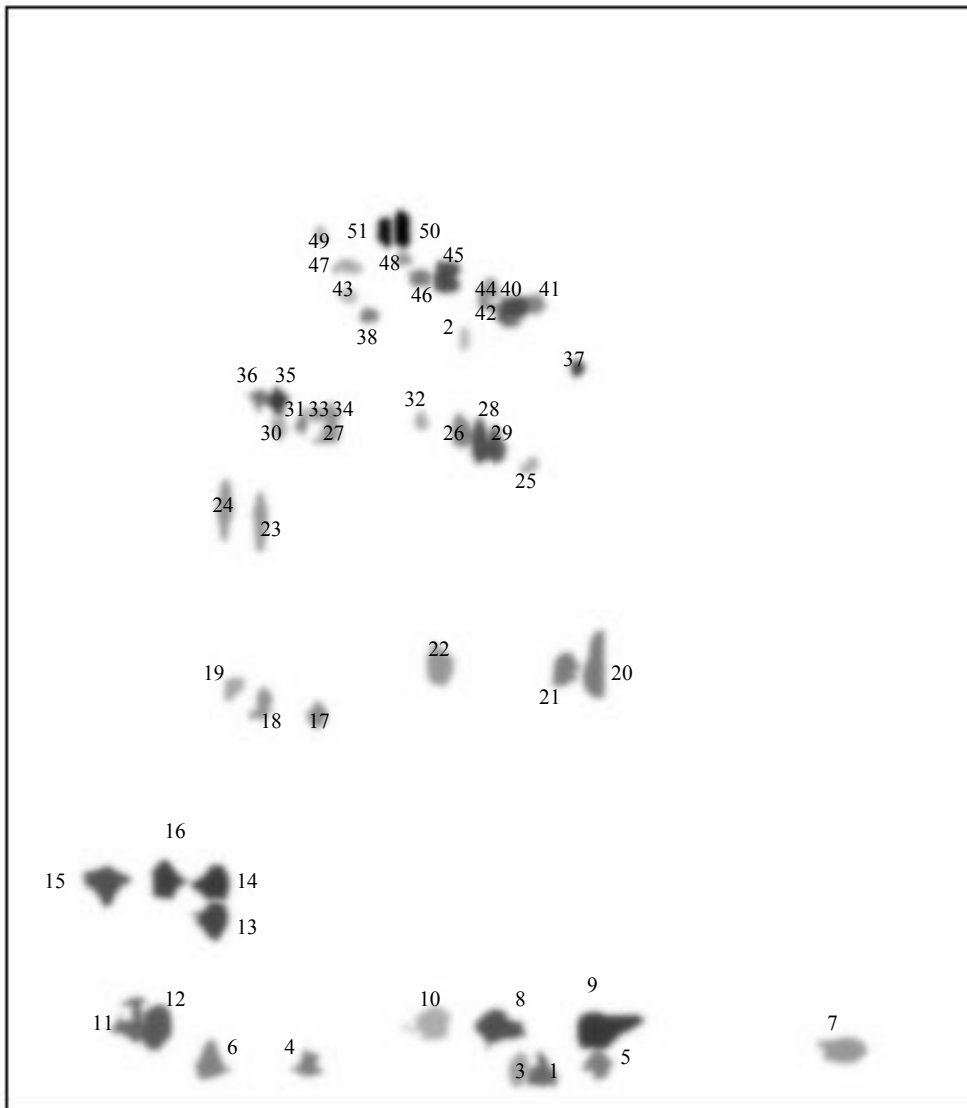


Figura 6: Gel sintetico controllo sano

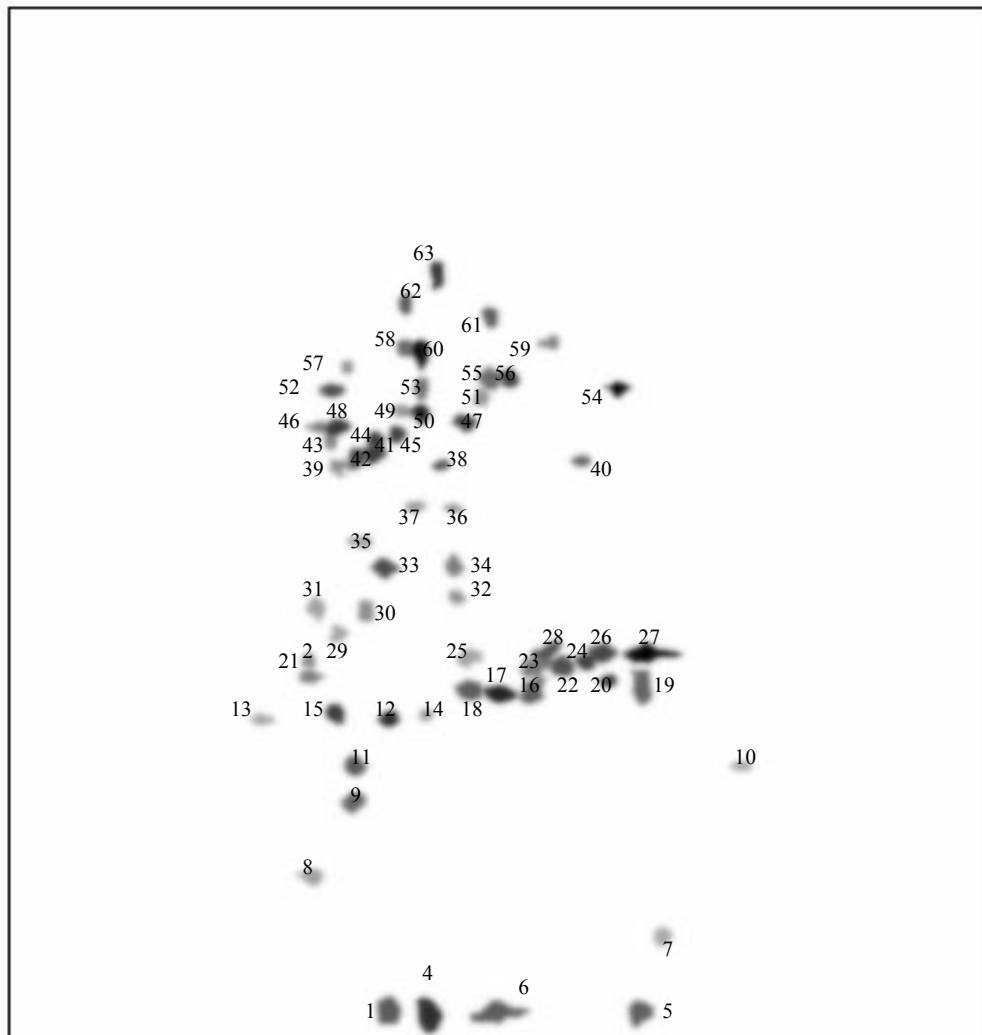


Fig 7: Gel sintetico Sindrome di Sjogren

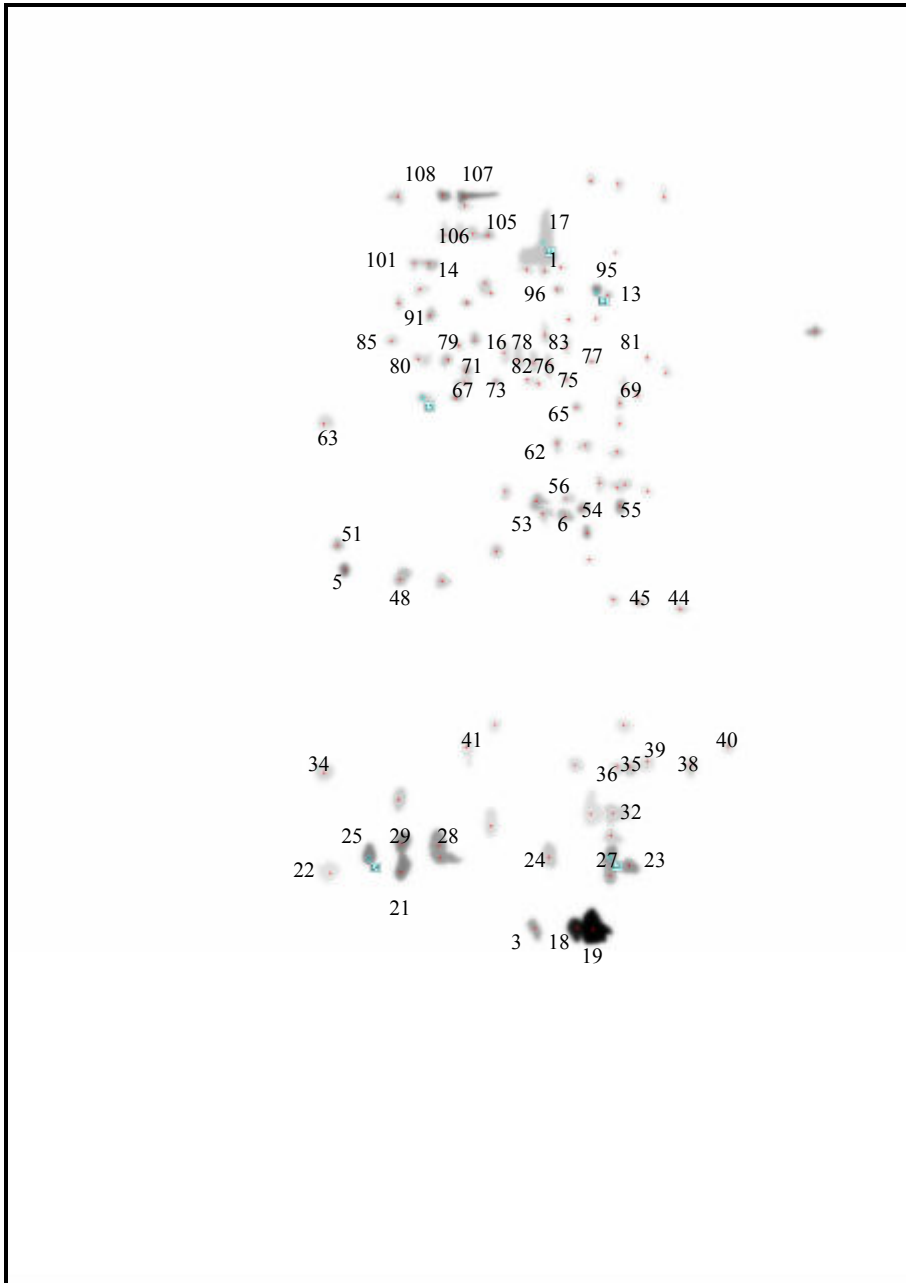


Fig 8: Gel sintetico Sindrome Sicca Idiopatica

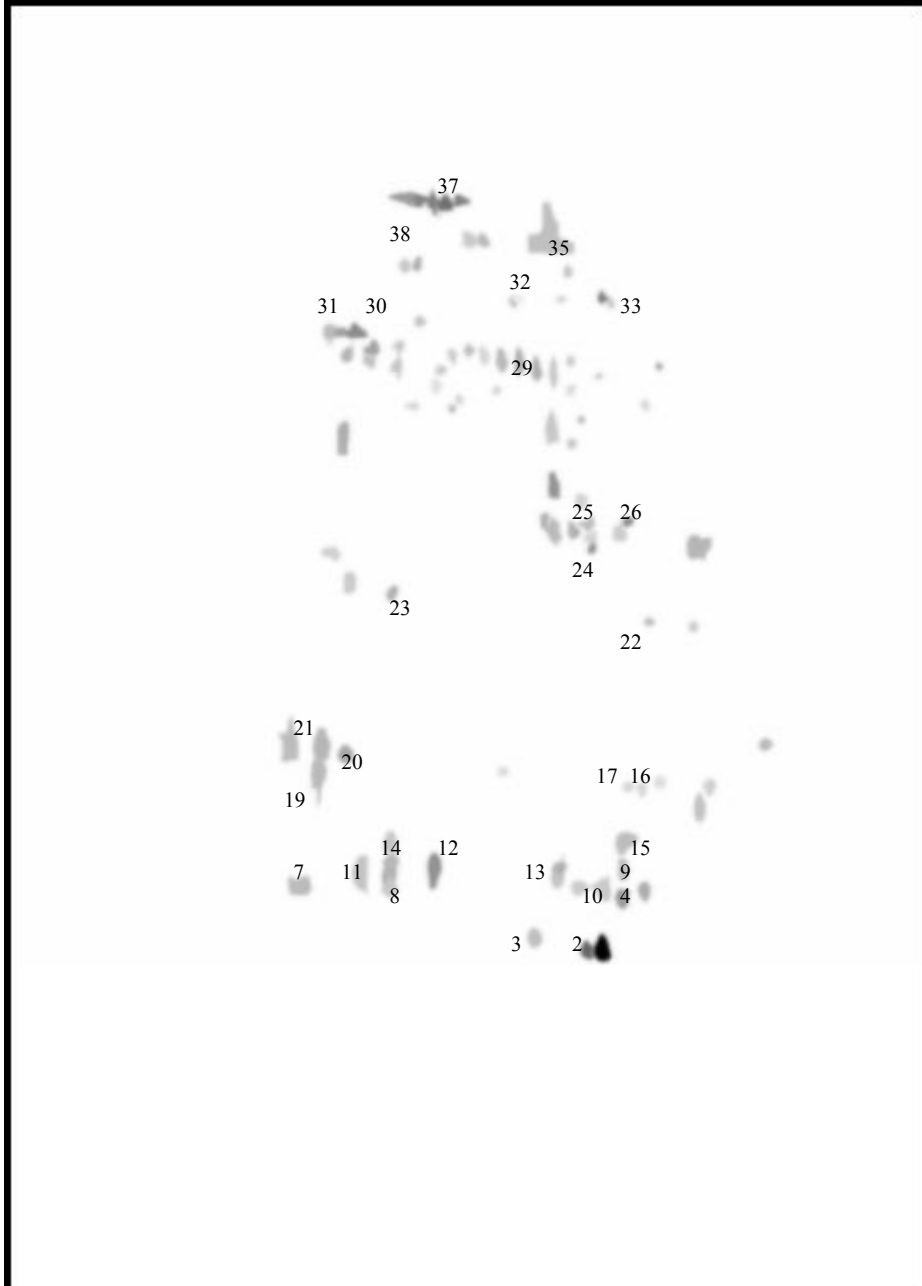


Fig 9: Gel sintetico pazienti con anticorpi anti-Ro/SSA

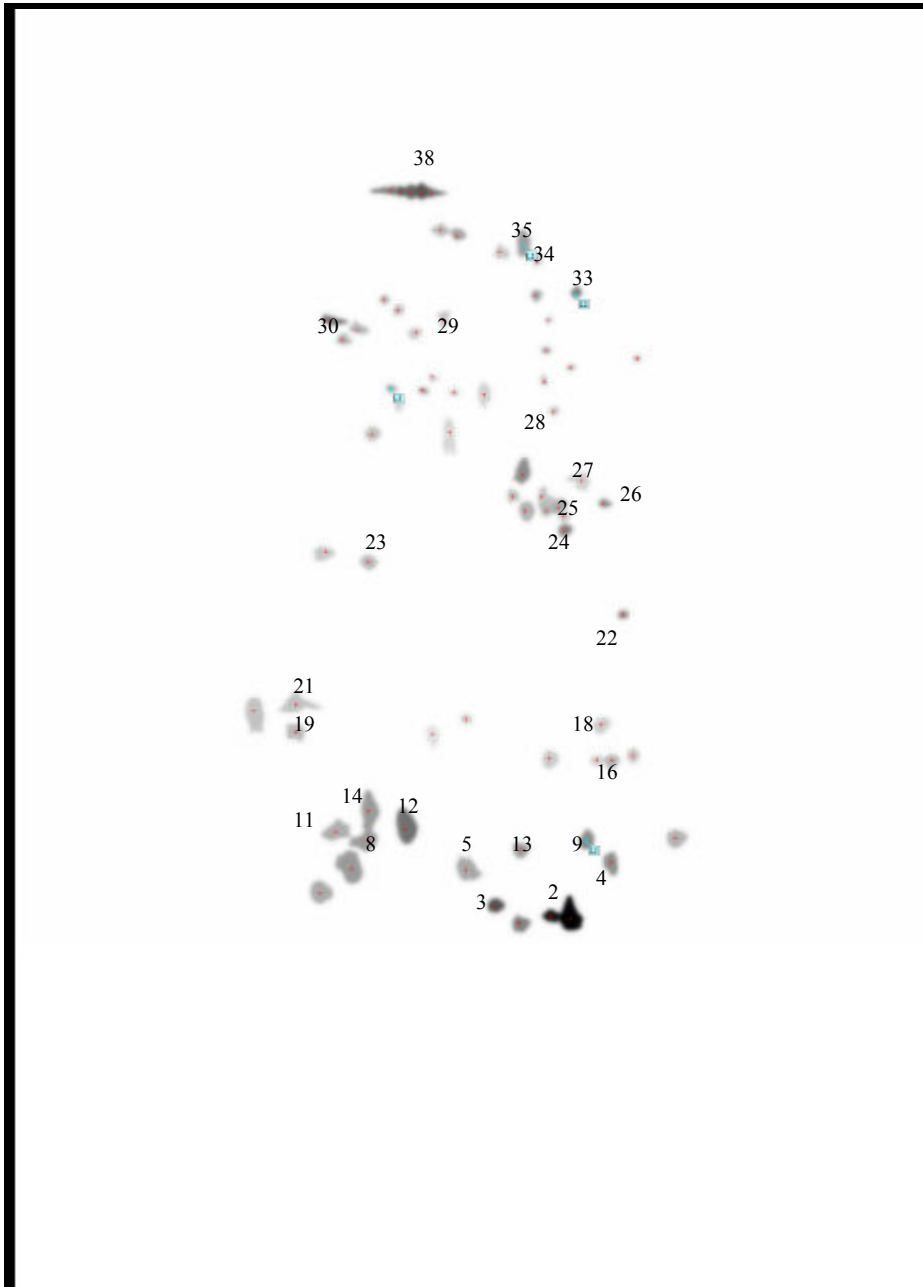


Fig 10: Gel sintetico pazienti con anticorpi anti- Ro/SSA e anti-La/SSB

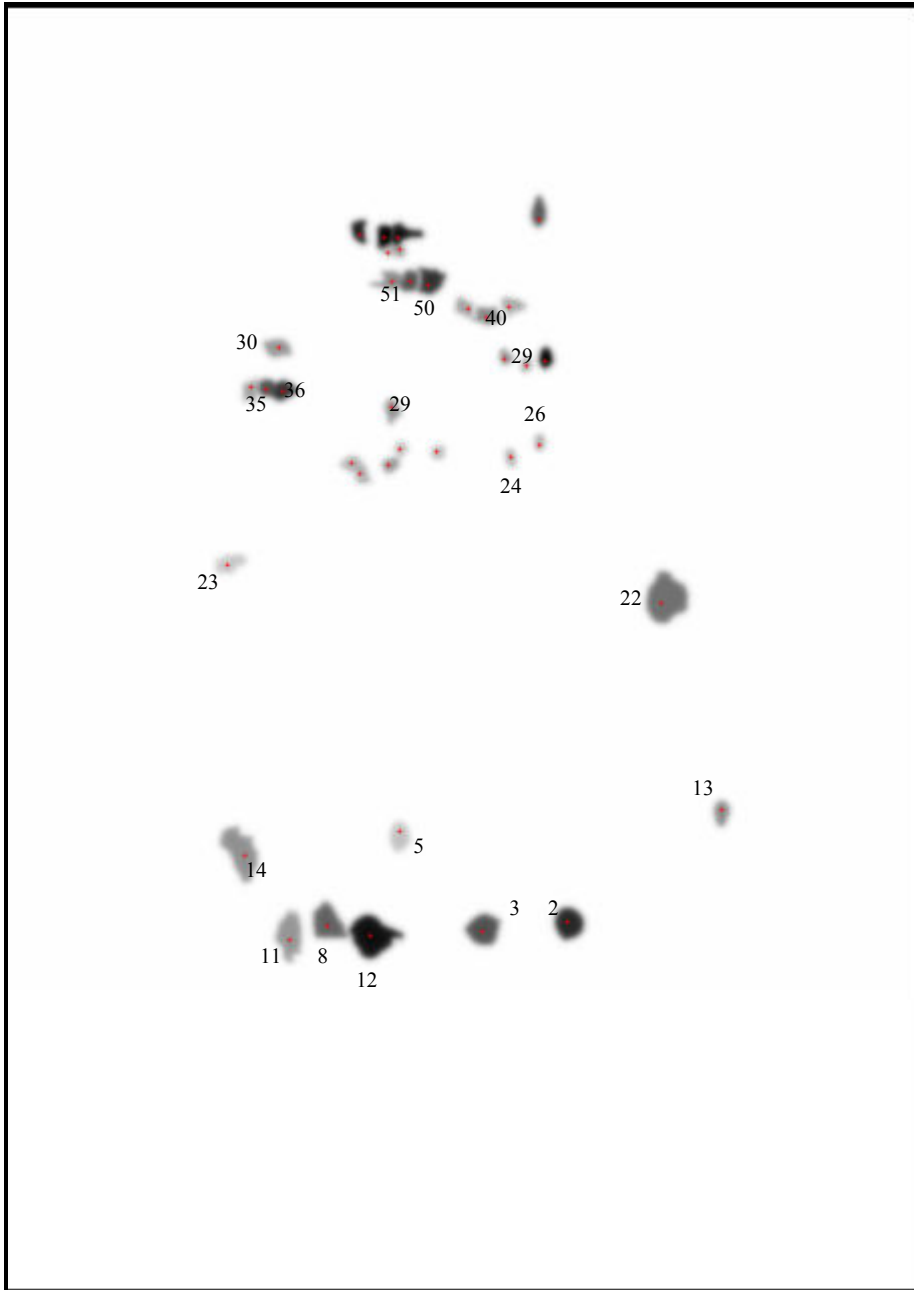


Fig 11. Gel sintetico Sclerosi Sistemica Progressiva

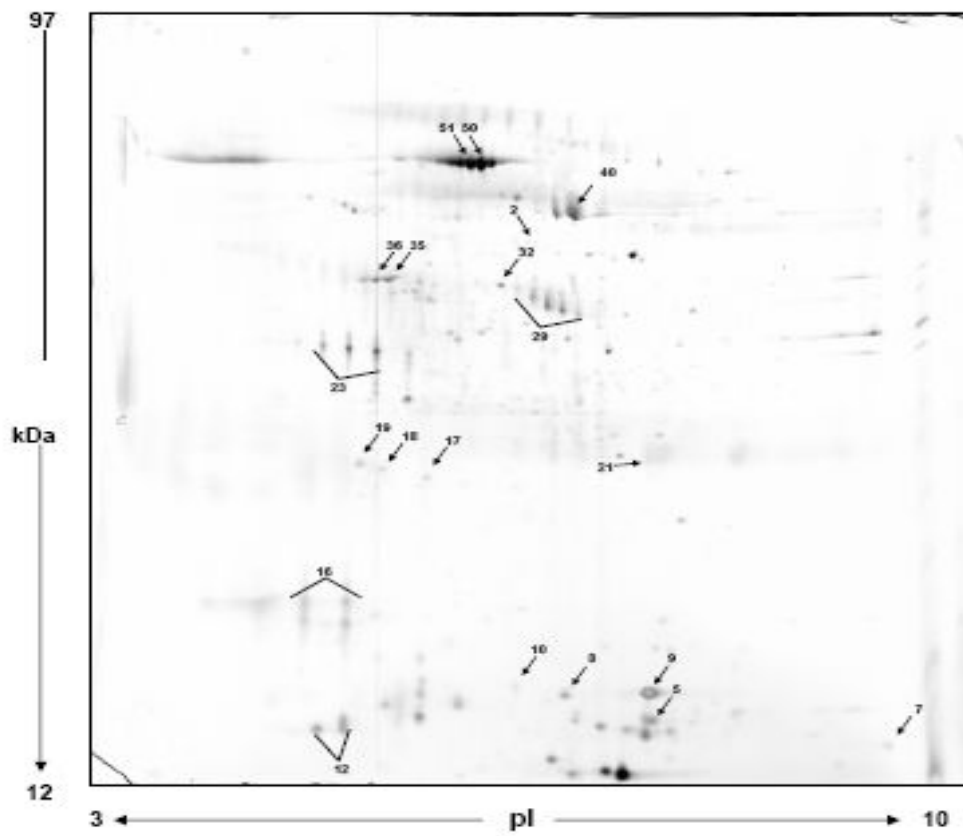


Fig 12: Gel rappresentativo controllo sano

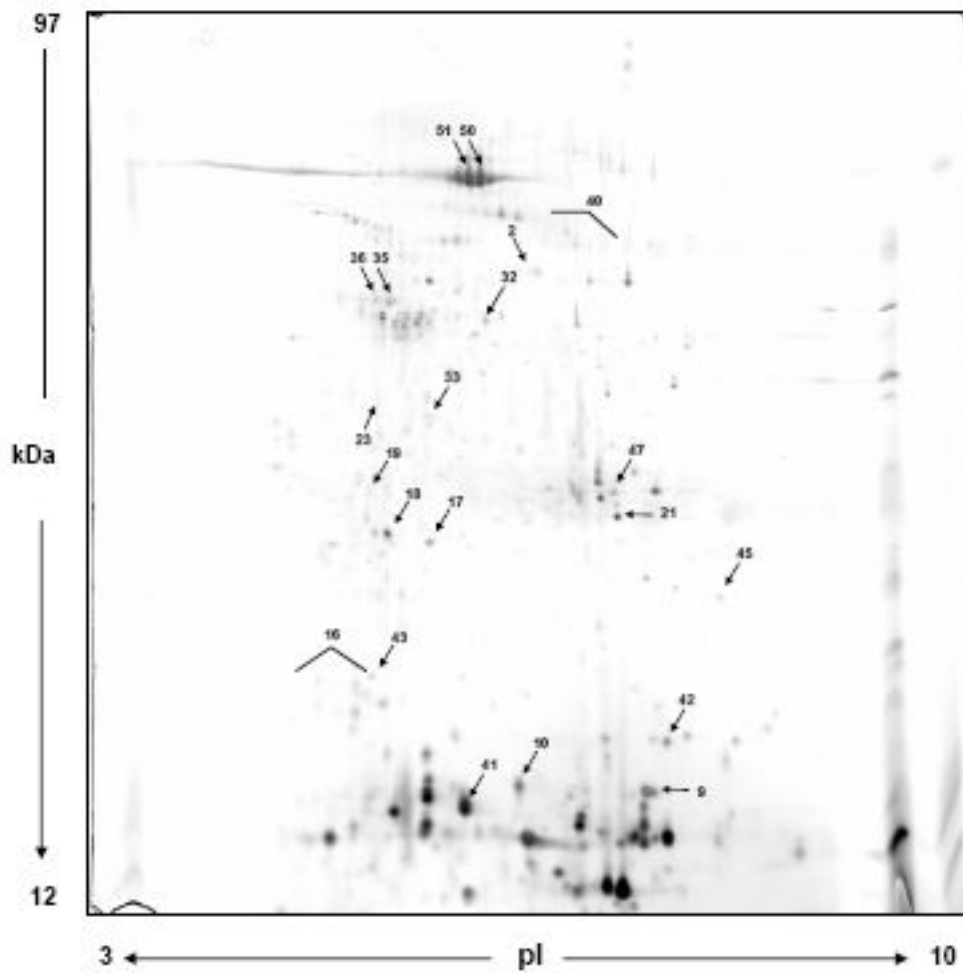


Fig 13: Gel rappresentativo Sindrome di Sjogren

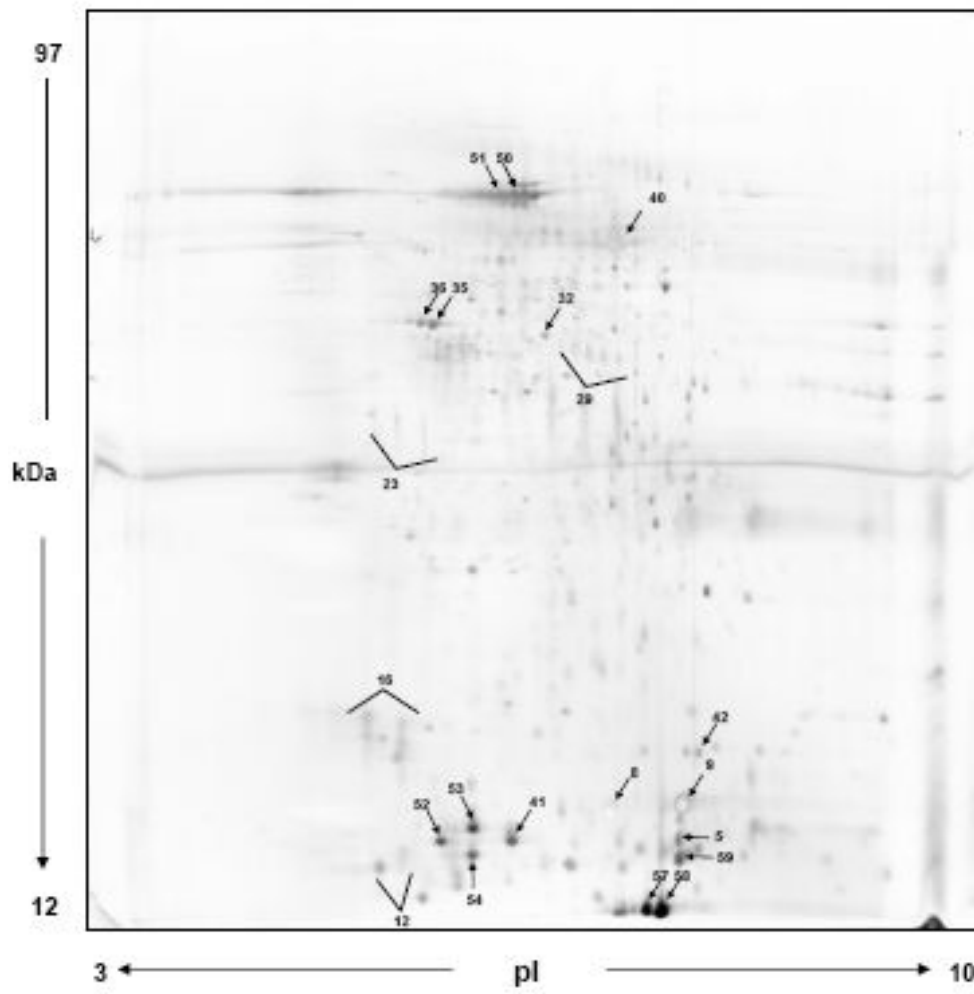


Fig 14: Gel rappresentativo Sindrome Sicca Idiopatica

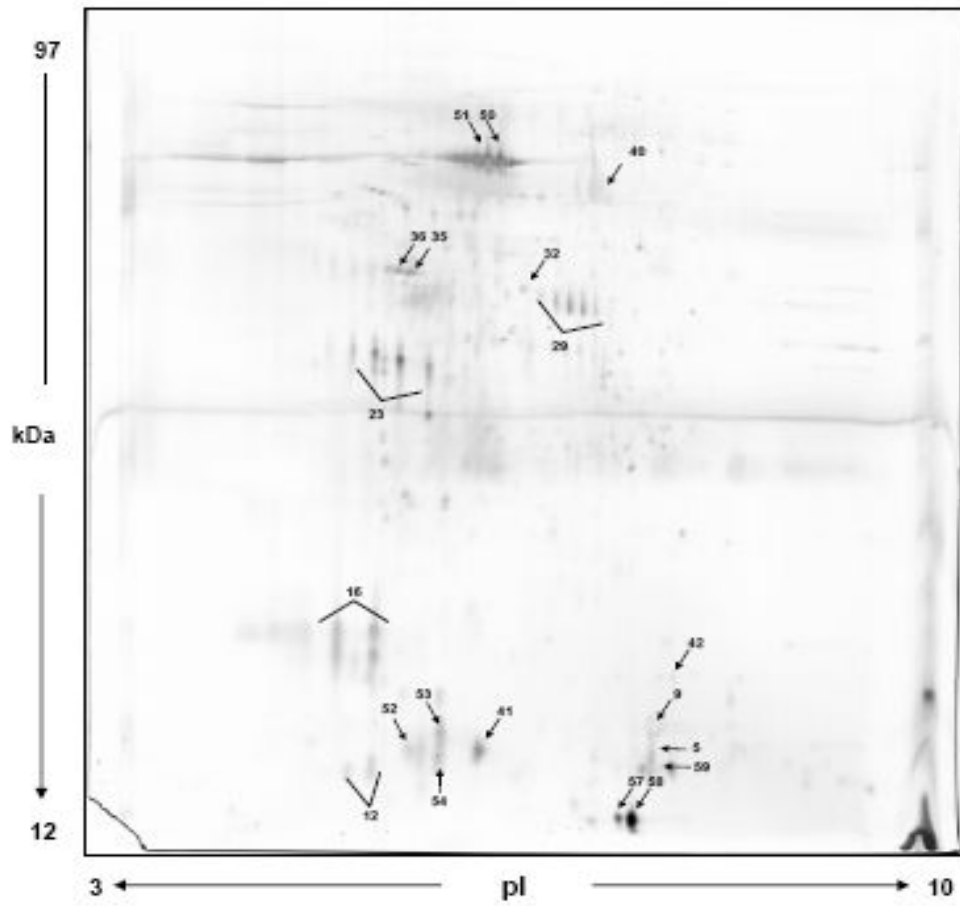


Fig 15: Gel rappresentativo dei pazienti con anticorpi anti-Ro/SSA

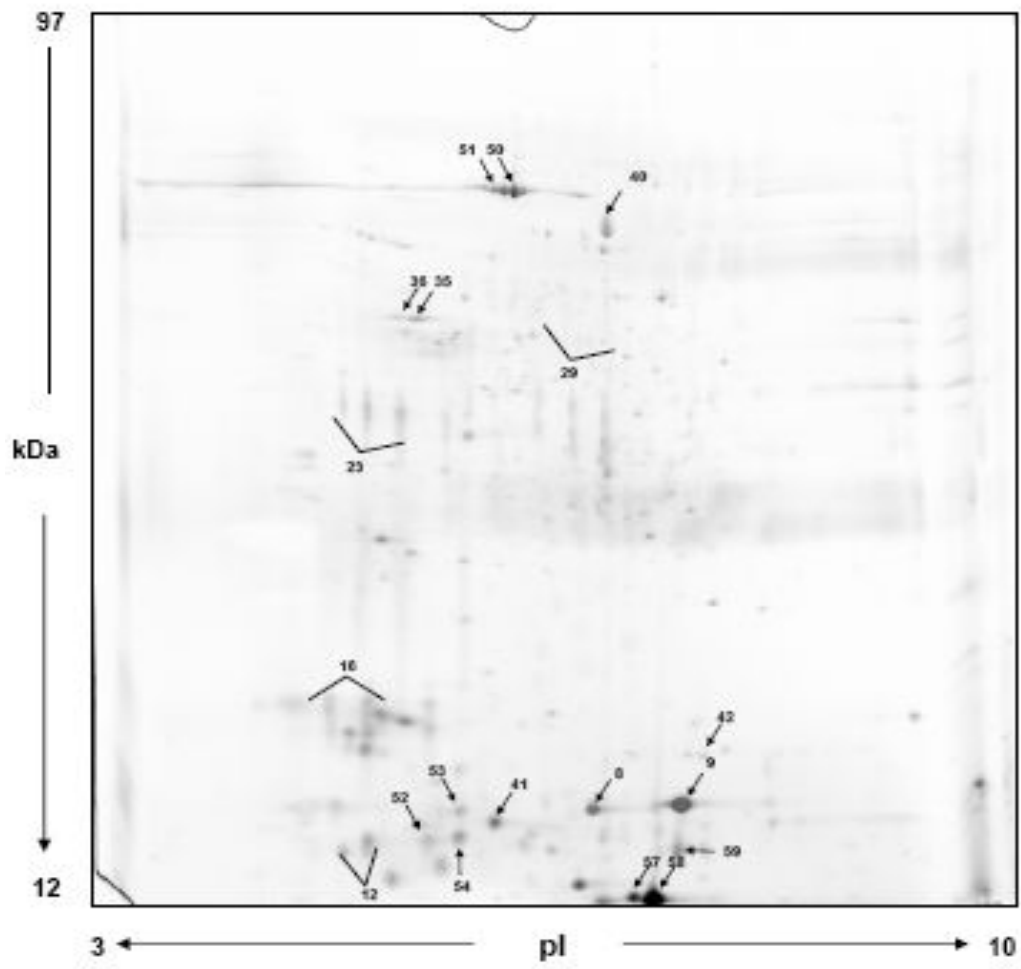


Fig 16: Gel rappresentativo pazienti con anticorpi anti-Ro/SSA e anti-La/SSB

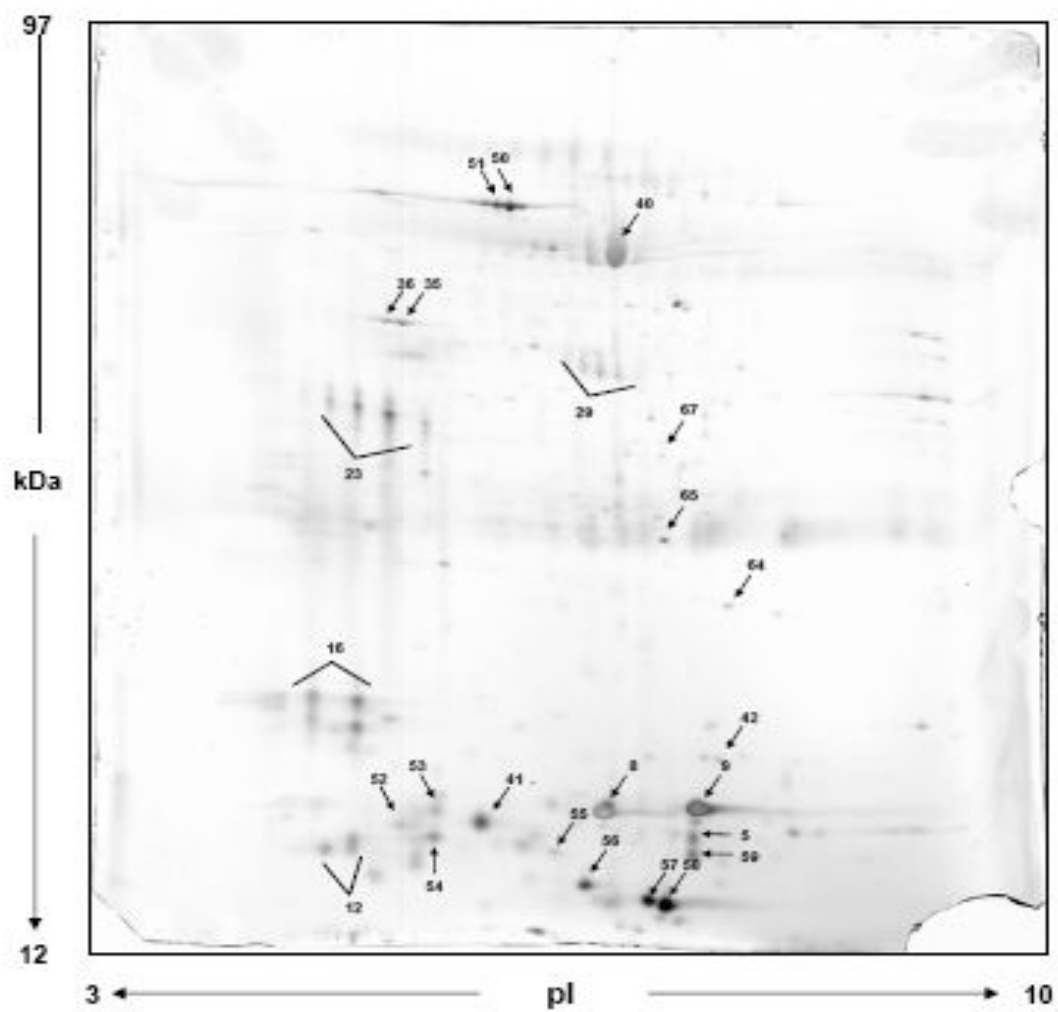


Fig 17: Gel rappresentativo Sclerosi Sistemica Progressiva



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PISA

Facoltà di Medicina e Chirurgia
Dottorato in Fisiopatologia Medica e Farmacologia
Anno Accademico 2005-2006

Tesi di dottorato:

**“Analisi proteomica della saliva
in pazienti affetti da Sindrome di Sjogren primitiva”**

Relatore: Prof. Stefano Bombardieri

Candidato: Chiara Baldini

INDICE:

| | |
|--|-------------------|
| RIASSUNTO | pag. 3-4 |
| I. INTRODUZIONE | |
| Ia. SjS: aspetti epidemiologici, eziopatogenetici, clinici e diagnostici | pag. 5-16 |
| Ib. SjS: modificazioni qualitative e quantitative nella composizione della saliva | pag. 17-18 |
| Ic. La proteomica | pag. 19-26 |
| Id. Applicazioni cliniche dell'analisi proteomica allo studio della saliva | pag. 27-29 |
| II. SCOPO DEL LAVORO | pag. 30-31 |
| III. MATERIALI E METODI | |
| IIIa. Pazienti | pag. 32-33 |
| IIIb. Materiali e strumentazione | pag. 34 |
| IIIc. Raccolta e preparazione del campione | pag. 34-36 |
| IIId. Elettroforesi bidimensionale | pag. 36-42 |
| IIIe. MALDI-TOF | pag. 42-43 |
| IIIf. Analisi statistica | pag. 43 |
| IV RISULTATI | |
| IVa. Analisi dei gel sintetici | pag. 44-50 |
| IVb. Analisi quantitativa delle proteine di interesse | pag. 50-53 |
| V. DISCUSSIONE | pag. 54-57 |
| VI. CONCLUSIONI | pag. 58-59 |
| VII. BIBLIOGRAFIA | pag. 60-68 |
| ALLEGATI | pag. 69-80 |

RIASSUNTO

La Sindrome di Sjogren primitiva (SjS) è una malattia autoimmune sistemica a patogenesi multifattoriale che colpisce in maniera peculiare le ghiandole esocrine salivari e lacrimali. La flogosi cellulo-mediata determina una progressiva compromissione della funzione ghiandolare che si traduce, dal punto di vista clinico, in una tipica sindrome secca caratterizzata da secchezza orale e oculare persistenti.

Scopo del lavoro: considerando la peculiarità della SjS nel coinvolgimento diretto delle ghiandole salivari maggiori e minori, l'ipotesi di lavoro che ha guidato questo studio è stata quella di verificare se il fluido salivare dei pazienti potesse rispecchiare, nella composizione proteica, le alterazioni anatomico-funzionali determinate dalla malattia a livello del tessuto ghiandolare. Scopo del lavoro è stato, quindi, quello di caratterizzare mediante analisi proteomica il profilo proteico salivare di pazienti affetti da SjS e comparare il pattern ottenuto con quello di controlli sani e di un gruppo di controlli "patologici" al fine di identificare eventuali biomarkers di malattia.

Pazienti e metodi: Sono stati arruolati nello studio: 15 pazienti con diagnosi di SjS, formulata in accordo con i Criteri Internazionali validati per la diagnosi di malattia, 15 controlli sani e 30 "controlli patologici" comparabili per sesso ed età. Nell'ambito dei 30 controlli patologici: 15 soggetti risultavano affetti da Sclerodermia sistemica progressiva (malattia autoimmune sistemica in grado di determinare un impegno fibrotico non flogistico delle ghiandole salivari), 6 presentavano una Sindrome Sicca Idiopatica non immunomediata e, 9 soggetti risultavano asintomatici per quanto relativo alla secchezza delle mucose ma erano portatori di autoanticorpi patologici (anti Ro/SSA e anti La/SSB), altamente specifici per la SjS. La caratterizzazione del profilo proteico salivare è stata effettuata combinando l'elettroforesi bidimensionale con la spettrometria di massa (MALDI-TOF mass spectrometry). I campioni sono stati raccolti in condizioni standard, centrifugati a 14000 g per 20 minuti a 4°C per rimuovere materiale insolubile e cellule, opportunamente preparati, e sottoposti ad elettroforesi bidimensionale. La prima dimensione è stata effettuata su strip di 18 cm in cui è presente un gradiente lineare di pH 3-10. La seconda dimensione è stata effettuata su gel di poliacrilammide 12% (20cm×20cm×1,5mm). I gel analitici sono stati colorati mediante Silver staining, mentre i gel preparativi per la spettrometria di massa con il Blu Coomassie Colloidale. Le immagini dei gel sono state acquisite tramite uno scanner (Epson Expression 1680) e analizzate con il programma Image Master 2D Platinum 5.0 dell'Amersham Bioscience. Gli spot di interesse sono stati, infine, identificati mediante MALDI-TOF mass spectrometry.

L'analisi statistica è stata condotta mediante test ANOVA per il confronto delle medie tra più gruppi analizzati simultaneamente e mediante *t*-test per il confronto delle medie dei gruppi a due a due. Un p-value <0.05 è stato considerato statisticamente significativo.

Risultati: Lo studio ha permesso mettere in evidenza numerose differenze tra il pattern proteico salivare dei pazienti con SjS ed i profili proteici salivari dei soggetti sani e dei controlli patologici. In particolare, nei pazienti con SjS è stato possibile osservare una riduzione nei livelli di espressione di alcune tipiche proteine salivari acinari (albumina, α -amilasi salivare, PIP, cheratina 6L, anidrasi carbonicaVI), un'alterata espressione di proteine coinvolte nell'equilibrio proteasi / antiproteasi con una riduzione delle cistatine e dei loro precursori e un incremento dell'inibitore dell'elastasi leucocitaria, un incremento di proteine coinvolte nel danno tissutale (actina, lipocalina-1 precursore) e, infine, un'aumentata espressione di proteine infiammatorie e legate all'autoimmunità (calgranulina B, ciclofillina A, catena leggera κ delle immunoglobuline, beta2-microglobulina).

Conclusioni: Lo studio, seppure preliminare, ha permesso di documentare come il pattern proteico salivare dei pazienti con SjS risulti profondamente alterato e presenti aspetti peculiari che, in parte riflettono l'impegno flogistico selettivo da parte della malattia delle ghiandole salivari, in parte riflettono le alterazioni dell'ambiente orale che essa induce e, in parte, infine, la natura autoimmune sistemica della SjS. L'insieme delle alterazioni osservate suggerisce che il dosaggio dei livelli salivari di un numero limitato di proteine, identificate tramite analisi proteomica, possa costituire un valido ausilio nella diagnosi di malattia, configurando una sorta di algoritmo proteico da applicare soprattutto nei casi che rimangono dubbi nelle indagini di diagnostica tradizionale. Complessivamente, quindi, seppure a livello preliminare, lo studio ha mostrato come l'analisi proteomica di fluidi biologici scarsamente complessi e facilmente reperibili come la saliva possa rappresentare un'ulteriore ausilio nella diagnosi delle malattie reumatiche, in generale, e della SjS in particolare.

I.INTRODUZIONE

Ia. Sindrome di Sjogren: aspetti epidemiologici, eziopatogenetici, clinici e diagnostici

La sindrome di Sjogren (SjS) è una malattia autoimmune sistemica che colpisce caratteristicamente le ghiandole esocrine ed in particolare le ghiandole salivari e quelle lacrimali manifestandosi, clinicamente, con una sindrome secca oculare e orale che deriva dal coinvolgimento anatomico e funzionale delle ghiandole stesse (1).

Dal punto di vista nosografico la malattia può presentarsi in forma isolata (SjS idiopatica o primitiva), oppure in associazione ad altre malattie autoimmuni come l'Artrite Reumatoide, il Lupus Eritematoso Sistemico o la Sclerodermia: si parla in tal caso di SjS secondaria (2).

La SjS primitiva ha una distribuzione ubiquitaria e colpisce preferenzialmente soggetti di sesso femminile (rapporto femmine: maschi = 9:1) con un primo picco di incidenza nella II-III decade di vita ed un secondo picco in età post-menopausale, nella V decade di vita. I dati relativi alla prevalenza e all'incidenza di malattia sono estremamente discordanti e sono condizionati dai criteri classificativi utilizzati nei diversi studi epidemiologici; in tal senso, il tasso di prevalenza della SjS è stimato in un range variabile tra lo 0.15% e il 3.3%, mentre il tasso di incidenza varia da 1: 1000 a 1: 100 a seconda dei diversi studi in esame (3-6). Le discrepanze degli studi epidemiologici condotti sulla malattia possono, almeno in parte essere giustificate dal fatto che criteri classificativi per la SjS primitiva e secondaria, accettati a livello internazionale, sono stati elaborati solo recentemente, nell'ambito dell' American-European Consensus Group nel 2002 (7) (Tabella 1). Utilizzando tali criteri la prevalenza della malattia è stimata pari a circa lo 0.5% nella popolazione adulta (8).

Tabella 1: *American European Consensus Criteria 2002*

| |
|---|
| 1. Sintomi oculari Una risposta positiva almeno ad una delle seguenti domande: Ha sensazione quotidiana di occhi secchi da oltre tre mesi? Ha sensazione di sabbia/corpo estraneo negli occhi? Utilizza lacrime artificiali per più di tre volte al giorno? |
| 2. Sintomi orali Una risposta positiva almeno ad una delle seguenti domande: Ha sensazione quotidiana di bocca secca da oltre tre mesi? Ha tumefazione ricorrente o persistente delle ghiandole salivari? Deve bere molto per inghiottire cibi secchi? |
| 3. Segni Oculari Schirmer test (<5 mm in 5 min) Rosa Bengala positivo |
| 4. Istopatologia Focus score > 1 (Focus: aggregato di almeno 50 cellule mononucleate adiacente ad acino intatto, Focus score numero di foci per 4 mmq) |
| 5. Impegno delle ghiandole salivari Scintigrafia salivare Scialografia parotidea Riduzione del flusso salivare (< 1,5 ml in 15 min) |
| 6. Autoanticorpi Ro-SSA e/o La-SSB |

Per SjS primario:

- Presenza di 4 criteri su sei positivi di cui almeno uno sia rappresentato dall'istopatologia o dalla sierologia
- Presenza di 3 dei 4 criteri "obiettivi" (punti 3 ,4 ,5 ,6)

Per SjS secondario: criteri 1 e 2 + almeno due tra 3, 4 e 5

Criteri di esclusione: radioterapia, HCV, AIDS, linfoma pre-esistente, sarcoidosi, GVHD, uso di farmaci anticolinergici

Dal punto di vista eziopatogenetico la SjS è descritta come un processo sequenziale “multistep” di tipo multifattoriale che sembrerebbe originare dall’interazione tra fattori di predisposizione genetica e agenti esogeni ambientali in grado di innescare risposte autoimmunitarie abnormi, sia da parte dei linfociti T che dei linfociti B, rivolte contro auto-antigeni tissutali; tali risposte sarebbero in grado di sostenere, perpetuare e amplificare il danno tissutale portando ad uno stato infiammatorio cronico e ad una progressiva perdita funzionale degli organi colpiti (2). I fattori di predisposizione genetica suggeriti sono essenzialmente rappresentati dai geni del sistema maggiore di istocompatibilità (HLA). La SjS è, infatti, strettamente associata all’espressione dell’HLA-DR3 e dei geni ad esso correlati B8 e DQ2. Tale associazione è particolarmente forte per i soggetti con SjS che producono anticorpi anti-Ro/SSA (9). Oltre al sistema HLA gli studi più recenti hanno focalizzato l’attenzione su geni polimorfici che codificano per molecole coinvolte fisiologicamente nella risposta immunitaria come il gene dell’IL-10 (aplotipo GCC), il gene del TNF alfa (allele TNF-308A) e il gene della catena alfa del recettore dell’IL4. Altri polimorfismi genici sono stati osservati a carico del gene della lectina legante il mannosio e dei recettori di alcune chemochine, in particolare del recettore CCR5 che lega le chemochine chemoattrattanti delle cellule mononucleari CCL3, CCL4 e CCL5 (10). Anche gli agenti ambientali legati alla patogenesi della SjS sono molteplici ma, in primis, sono chiamati in causa fattori ormonali (ruolo protettivo degli androgeni e pro-infiammatorio degli estrogeni che sembrerebbero contrastare l’apoptosi dei cloni linfocitari auto-reattivi) e numerosi agenti virali scialotropi come il virus di Epstein-Barr (EBV), il virus dell’epatite C (HCV) ed il retrovirus-I della leucemia umana a cellule T (HTLV-I) (10). Negli ultimi anni, il gruppo di Moutsopoulos ha identificato la presenza di RNA virale di Coxsackie virus nelle biopsie delle ghiandole salivari minori di pazienti con SjS e un’omologia di sequenza dell’87% tra un peptide derivato dalla proteina 2B dei Coxsackievirus e la regione 222-229 dell’epitopo lineare maggiore dell’auto-antigene Ro60KD, che è considerato uno degli auto-antigeni più specifici della SjS (11).

Alla luce delle più recenti acquisizioni, anche se l’eziologia della SjS rimane ancora in larga parte sconosciuta, sono stati elaborati diversi modelli patogenetici in grado di spiegare il ruolo dei diversi elementi cellulari nel danno ghiandolare che si verifica in corso di malattia. Il modello patogenetico più largamente condiviso è quello dell’“epitelite autoimmune” secondo il quale le cellule epiteliali rivestirebbero un ruolo cruciale nella formazione degli aggregati linfocitari periduttali (12). La SjS presenta, infatti, un quadro istopatologico caratterizzato da infiltrati linfocitari focali che interessano generalmente la

regione periduttale delle ghiandole esocrine ma che potenzialmente possono colpire qualunque organo e apparato (es. epitelio tubulare renale, epitelio bronchiale, epitelio dei colangioli epatici etc). Tali aggregati originano essenzialmente dalle interazioni tra le cellule epiteliali e le cellule immuni T e B. Gli aggregati linfocitari sono costituiti essenzialmente da linfociti CD4⁺ positivi che presentano essenzialmente un fenotipo memoria (CD45 RO⁺), esprimono il recettore TCR α/β e sono in grado di secernere INF- γ e IL-10. In percentuale minore sono stati evidenziati anche linfociti T CD8⁺ positivi che esprimono l'integrina (CD 103) e che si localizzano in prossimità di cellule epiteliali acinari E-caderina positive. Il rapporto CD4/CD8 a livello degli infiltrati è di 3:1-5:1. I linfociti B costituiscono solo il 20% degli infiltrati, e ancora più rari sono le cellule natural killer ed i macrofagi (complessivamente < 5%). Accanto agli infiltrati T linfocitari è possibile osservare frequentemente anche delle strutture ectopiche che sono analoghe ai centri germinativi e sono costituite essenzialmente da linfociti B, con una piccola percentuale di linfociti T e di cellule follicolari dendritiche. I linfociti B sono organizzati in una 'dark zone' centrale in attiva proliferazione (centroblasti) e in una zona più periferica 'light zone' di centrociti che vanno incontro a processi di selezione per l'espressione in superficie di anticorpi ad alta affinità. La presenza di questi centri germinativi ectopici è stata associata ad una più elevata positività di autoanticorpi anti Ro/SSA ed anti La/SSB, nonché ad un più alto rischio di trasformazione in senso linfoproliferativo (10). Secondo il "modello epitelitico" le cellule epiteliali, una volta attaccate da un ipotetico agente esogeno, si attiverebbero e inizierebbero a secernere elevate quantità di citochine pro-infiammatorie ed ad esprimere alti livelli di HLA DR richiamando in situ le cellule linfocitarie. Le cellule dell'epitelio ghiandolare fungerebbero da cellule presentanti l'antigene (APC) attivando i linfociti che potrebbero, a loro volta, interagire con i linfociti B innescando la risposta autoimmune (12). Un secondo modello proposto per la formazione degli aggregati è quello di una *disregolazione sistemica dei linfociti T circolanti*, ed in particolare dei linfociti Th1 positivi, che migrerebbero attivamente nelle ghiandole esocrine con un processo di homing mediato dall'adesione alle venule ad endotelio alto (HEV) fin dalle prime fasi di malattia. I linfociti Th1, attraverso la liberazione di citochine proinfiammatorie, ed in particolare di INF- γ , attiverebbero essi stessi le cellule epiteliali e le indurrebbero ad esprimere potenti chemoattrattanti in grado di richiamare altri linfociti e di amplificare il processo infiltrativo (13). I chemoattrattanti implicati sarebbero le chemochine, proteine a basso peso molecolare in grado di reclutare e attivare specifiche sottopopolazioni leucocitarie, modificando l'espressione e lo stato di

affinità delle molecole di adesione sulla superficie leucocitaria. Sulla scia di questa ipotesi, studi recenti hanno focalizzato l'attenzione, in particolare, su alcune chemochine INF- γ -indotte come la CXCL10 e la CXCL9, il cui mRNA è risultato up-regolato a livello delle cellule epiteliali dei dotti salivari dei pazienti con SjS rispetto ai controlli. Tali chemochine sarebbero in grado, a loro volta, di amplificare il processo richiamando ulteriori linfociti T CD3+ (14). Chemochine diverse come la CXCL13, chemoattrattanti verso i linfociti B, e il BAFF, citochina della superfamiglia del TNF, sarebbero, invece, coinvolte nella formazione delle strutture ectopiche simil germinative il cui ruolo nella successiva potenziale trasformazione linfomatosa rimane da chiarire (15). Recentemente, è stato ipotizzato, inoltre, che il ruolo dei linfociti B possa essere ancora più complesso dal momento che essi stessi sarebbero in grado di polarizzarsi, fungere da APC e produrre INF- γ , influenzando la differenziazione dei T-helper in senso T-helper 1. Questi dati porterebbero l'attenzione sui linfociti B come primi orchestratori del processo infiammatorio a carico delle ghiandole salivari (16). Comunque abbiano origine gli infiltrati linfocitari, una volta formati, essi comportano una progressiva distruzione dell'epitelio ghiandolare. Il principale meccanismo di distruzione dell'epitelio ghiandolare è rappresentato dalla morte cellulare programmata o apoptosi mediata dal sistema Fas/FasL e dal rilascio di perforina e granzima A (17). Anche se è ancora da chiarire se lo stimolo iniziale per il processo apoptotico sia intrinseco alle cellule epiteliali o sia mediato dai linfociti T, la formazione di blebs di membrana durante l'apoptosi porterebbe alla traslocazione a livello di membrana di componenti auto-antigeniche intracellulari che in questo modo guadagnerebbero l'ambiente extracellulare e potrebbero evocare la risposta auto-anticorpale. Un altro ulteriore meccanismo di esposizione di auto-antigeni endocitari sarebbe la liberazione di esosomi da parte delle cellule epiteliali ovvero di vescicole di membrana risultanti dalla fusione di endosomi e lisosomi. Tale meccanismo è stato osservato in vitro ma non ancora in vivo (2). I meccanismi patogenetici descritti giustificano, in realtà, una distruzione del 50-60% delle strutture acinari con una riserva funzionale residua del 40% (18). L'entità della compromissione della funzione secretoria è molto superiore nella SS rispetto al danno organico, e ciò ha portato ad ipotizzare che altri meccanismi siano coinvolti nella patogenesi della malattia (18). A livello del tessuto ghiandolare residuo, in particolare, alcuni autori hanno ipotizzato una disregolazione del trasporto dei fluidi, sottolineando in particolare una anomala distribuzione dei canali numero 5 dell'acquaporina nelle ghiandole salivari. Nel tessuto ghiandolare dei soggetti con SjS i canali dell'acquaporina, che regolano i movimenti dell'acqua attraverso le

membrane biologiche, sarebbero espressi non solo a livello apicale luminale ma anche a livello basolaterale determinando un ristagno interstiziale dei fluidi e contribuendo al deficit secretivo. Tale anomala distribuzione sarebbe mediata dal TNF- α e da altre citochine pro-infiammatorie prodotte localmente (19). In letteratura sono presenti dati contrastanti in questo senso; secondo altri autori, infatti, la distribuzione e la densità dell'acquaporina 5 nelle ghiandole salivari non differirebbe nei pazienti con SS rispetto ai controlli sani (20). Altri autori, negli ultimi anni, hanno indagato possibili alterazioni del circuito neurosecretorio che regola il funzionamento delle ghiandole esocrine (21). Sul parenchima ghiandolare sono presenti recettori transmembrana di tipo muscarinico, in particolare gli M3, che legano l'acetilcolina e che regolano il trasporto di ioni e di acqua attraverso le membrane cellulari nei dotti ghiandolari. Il numero dei recettori M3 eccede quello delle sinapsi neuronali ed in questo modo l'acetilcolina rilasciata da una terminazione nervosa può stimolare più acini adiacenti a quello direttamente innervato. Le alterazioni funzionali a carico del circuito neurosecretivo riguardano essenzialmente il braccio efferente del circuito, mentre quello afferente rimane integro considerando che il paziente avverte i sintomi legati alla secchezza orale e oculare. Uno dei meccanismi potenzialmente responsabili dell'iposecrezione potrebbe essere rappresentato da un ridotto rilascio di neurotrasmettitori (Ach) a livello delle giunzioni sinaptiche e/o da un'alterata risposta ai neurotrasmettitori a livello post-sinaptico. Durante il processo infiammatorio, citochine pro-infiammatorie come l'IL-1, il TNF-alfa o l'IL-6, possono interferire con il rilascio di acetilcolina da parte delle terminazioni colinergiche, inibendolo. Anche la produzione di secondi messaggeri a livello post-sinaptico è, allo stesso modo, fortemente condizionata in senso negativo dalla presenza di tali citochine, e di conseguenza le cellule ghiandolari appaiono meno responsive ai segnali efferenti (18). Infine, studi recenti hanno evidenziato un terzo meccanismo di alterazione del circuito neurosecretivo legato alla presenza di elevati livelli di anticorpi anti-M3R nei pazienti con SjS in grado di fungere da antagonisti muscarinici e di inibire la contrazione della muscolatura liscia (21). Il blocco del M3R potrebbe interferire con la secrezione ghiandolare anche contribuendo alla traslocazione dei canali dell'acquaporina (20). In conclusione la patogenesi della sindrome di Sjogren rimane ancora in larga parte da chiarire potendo essere legata sia ad un danno organico che ad un danno funzionale dei diversi parenchimi ghiandolari.

A fronte di tale complessità patogenetica il quadro clinico della sindrome di Sjogren è relativamente uniforme, essendo dominato dai sintomi legati alla secchezza delle mucose orale e oculare. Il coinvolgimento degli altri organi e apparati, seppure potenziale, si

manifesta in una minoranza dei pazienti, solitamente nelle fasi più tardive di malattia e con un'intensità clinica generalmente di tipo lieve-moderato (22). La sintomatologia oculare è caratterizzata da quadri di cheratocongiuntivite secca con ipolacrimazione, arrossamento della congiuntiva e sensazione persistente di corpo estraneo nell'occhio. Nei casi più gravi possono insorgere infezioni oculari ricorrenti e possono manifestarsi abrasioni della superficie corneale ed ulcere che possono comportare un deficit del visus (23). La sintomatologia orale è, invece, caratterizzata da una persistente xerostomia con difficoltà nella masticazione, nell'eloquio e necessità di assumere liquidi molto frequentemente. I pazienti possono riferire, inoltre, modificazioni del gusto (es. 'sensazione metallica in bocca', 'bocca amara'), tosse secca, disfagia, disagio nel portare protesi dentarie e, infine, nicturia con disturbi del ritmo sonno-veglia secondaria all'eccessiva assunzione di liquidi durante le ore diurne. Inoltre, a seconda delle casistiche, danni a carico dei processi di mineralizzazione dentaria ed alterazioni della flora microbica orale con aumento relativo dei batteri 'cariogeni' e delle diverse specie di *Candida* sono osservati fin nell'80% dei pazienti (24). All'esame obiettivo la mucosa orale appare eritematosa e asciutta e di solito si osserva la mancanza di saliva sul pavimento della bocca e/o la presenza di saliva particolarmente densa e viscosa in corrispondenza dello sbocco dei dotti delle ghiandole salivari maggiori. La superficie dorsale della lingua è spesso anch'essa arrossata e può presentare atrofia delle papille filiformi e fissurazioni laterali. In un terzo circa dei pazienti, infine, le ghiandole salivari maggiori possono presentare tumefazioni ricorrenti e bilaterali; la tumefazione delle parotidi è la più evidente ma spesso è preceduta da quella delle ghiandole sottomandibolari che, tuttavia, può essere misconosciuta (25). Nell'ambito delle manifestazioni sistemiche la malattia può potenzialmente colpire tutti gli organi e gli apparati. La tabella 2 riassume i principali quadri clinici descritti in letteratura e la loro prevalenza. La complicanza più temibile della malattia è tradizionalmente considerata l'insorgenza di una malattia linfoproliferativa e, in particolare, di un linfoma non Hodgkin a cellule B, che generalmente è un linfoma di basso grado della zona marginale. In realtà, ad oggi, studi trasversali hanno evidenziato come solo il 4% dei pazienti con SjS presenti tale complicanza ed il solo studio prospettico longitudinale che ne ha valutato l'incidenza, ha evidenziato come il 7% di pazienti con SjS abbia sviluppato tale affezione in un follow-up di cinque anni (26, 27). Tuttavia, analizzando le possibili cause di morte nei soggetti con SjS, non si evidenziano differenze statisticamente significative rispetto alla popolazione generale, se non per il rischio legato proprio alle complicanze linfoproliferative che sono responsabili di un eccesso di mortalità pari a 2.53 per 1000

persone-anno (8). Uno studio multicentrico europeo, condotto su 33 pazienti seguiti in 9 centri, ha, pertanto, recentemente cercato di mettere in evidenza le caratteristiche del subset di pazienti a rischio per linfoma, identificando nella presenza di linfadenopatia, vasculite cutanea, ipocomplementemia, coinvolgimento del sistema nervoso periferico, febbre, anemia e linfopenia potenziali fattori predittivi per una prognosi negativa (28). Fatta eccezione per le complicanze linfomatose, la SjS si presenta, invece, in conclusione, come una malattia a carattere relativamente favorevole e scarsamente aggressiva, anche se a decorso lentamente progressivo, nella quale la qualità di vita dei pazienti è condizionata essenzialmente dalla sintomatologia ghiandolare (29).

Tabella 2: Manifestazioni extraghiandolari e prevalenza

| Apparato/Organo | Quadri clinici | Prevalenza |
|------------------------|---|-------------------|
| Muscoloscheletrico | Artralgie | 60-70% |
| | Artrite | 10-20% |
| | Mialgie | 30-50% |
| Cardiovascolare | F. di Raynaud | 15%-35% |
| Respiratorio | Xerotrachea | 20%-25% |
| | Afezioni bronchiolari di tipo ostruttivo | 20%-33% |
| | Interstiziopatia polmonare (clinica e subclinica) | 8%-35% |
| Genito-urinario | Nefropatia tubulointerstiziale | 15%-20% |
| | Glomerulonefrite | 2%-5% |
| | Dispareunia | 10%-30% |
| Gastroenterico | Disfagia | 25-30% |
| | Epatopatia autoimmune | 5% |
| Cute | Vasculite cutanea | 10% |
| | Xerosi cutanea | 23%-68% |
| ORL | Ipoacusia | 27% |
| Ematologico | Anemia | 18% |
| | Leucopenia | 18% |
| | Linfopenia | 9% |
| SNP | Multinevrite sensitivo motoria | 2-10% |
| | Neuropatia autonoma | ? |
| Endocrino | Tireopatia | 30% |

Dal punto di vista dei dati di laboratorio, nella SjS, gli esami ematochimici routinari possono documentare un'ipergammaglobulinemia policlonale (80%) ed un rialzo della velocità di eritrosedimentazione in presenza di valori normali o solo modificamente alterati della proteina C reattiva (10). La SjS è caratterizzata anche da un ampio spettro di autoanticorpi non organo specifici che comprendono: anticorpi antinucleari (80%), fattore reumatoide (60-90%), anticorpi anti-Ro/SSA (60-80%) e anti-La/SSB (40-60%). La positività del fattore reumatoide si riscontra in media nel 60% dei soggetti ma una caratteristica peculiare della SjS è che, mentre nel siero è presente il fattore reumatoide di

classe IgM, nella saliva, invece, è evidenziabile un fattore reumatoide di tipo IgA, probabilmente prodotto localmente a livello ghiandolare (10). Gli anticorpi anti-Ro/SSA e anti-La/SSB sono considerati i più specifici per la SjS e fanno parte dei criteri classificativi per la malattia (7). Inoltre, gli anti-Ro/SSA sembrano correlare con l'impegno cutaneo vasculitico mentre gli anti-La/SSB con la tumefazione parotidea ed in genere con l'impegno extraghiandolare sistemico (30, 31). I bersagli antigenici degli anticorpi anti-Ro/SSA e anti-La/SSB sono costituiti da complessi ribonucleoproteici, fisiologicamente localizzati a livello citoplasmatico (70%) o intranucleare (30%). Sono descritte due proteine diverse di tipo Ro: una di 52 kDa e una di 60 kDa, mentre è nota una sola proteina di tipo La di 48 kDa. Il complesso ribonucleoproteico è costituito da RNA a basso peso molecolare (28 - 38 kDa) cui si possono fissare direttamente la proteina Ro 60 kDa (all'estremità 5') o la proteina La 48kDa (all'estremità 3'). La proteina Ro 52 kDa si fissa indirettamente all'RNA utilizzando come intermediario la Ro 60 kDa. La funzione delle molecole Ro e La rimane ancora in larga parte sconosciuta. La proteina La/SSB parteciperebbe ai fenomeni di trascrizione del DNA e nella fattispecie al complesso dell'elicasi ATP dipendente per la formazione dell'ibrido RNA/DNA; inoltre essa interverrebbe nella maturazione e nell'esportazione nel citoplasma dei trascritti dell'RNA polimerasi III. La Ro/SSA favorirebbe invece il trasporto dell'RNA dal nucleo al citoplasma. Nel nucleo la Ro 52 è fissata ad alcuni motivi del DNA e fungerebbe da regolatrice dell'espressione genica; la Ro 60, invece, inibirebbe la trascrizione operata dall'RNA polimerasi III (32). Nell'ambito dell'ampio spettro di autoanticorpi descritti un ruolo ancora controverso sembra essere svolto dagli anticorpi anti- α -fodrina. L' α -fodrina è una proteina di 240kDa che appartiene al citoscheletro cellulare e che è stata identificata in tutte le cellule, incluse quelle dei tessuti ghiandolari. Anticorpi anti- α -fodrina di classe IgG o IgA sono stati evidenziati sia nei modelli murini di SjS che nei pazienti con SjS in percentuali variabili tra il 52% e il 93%. Ad oggi, il significato clinico di questi autoanticorpi rimane ancora da chiarire anche se, poichè l' α -fodrina è associata con pompe e canali ionici di membrana, è stato ipotizzato che gli autoanticorpi anti- α -fodrina possano interferire con il funzionamento delle suddette pompe e quindi con la funzione secretoria delle ghiandole (33).

La diagnosi di SjS si basa sulla combinazione di elementi clinici, sierologici, strumentali e istologici. L'iter diagnostico prevede che la sintomatologia soggettiva del paziente relativa alla secchezza degli occhi e della bocca venga registrata mediante questionario validato

(34). Per l'obiettivazione di tale sintomatologia sono utilizzati test oculari per lo studio del film lacrimale (Test di Schirmer e Rosa Bengala) e test di valutazione morfologica e funzionale delle ghiandole salivari maggiori, quali la scialometria, la scialografia e la scintigrafia salivare. In particolare, il test di Schirmer consente di misurare la secrezione lacrimale utilizzando strisce di carta bibula poste nel fornice congiuntivale inferiore per 5 minuti. Il test è positivo se dopo 5' sono bagnati < di 5 mm della striscia di carta bibula. Il Rosa Bengala, oggi sostituito dal verde di lissamina, è, invece, un colorante specifico per cellule devitalizzate e mucina che, in presenza di un danno dell'epitelio congiuntivale o corneale, si fissa sulle cellule rendendo visibili le lesioni epiteliali (23). Dei test di valutazione delle ghiandole salivari maggiori, la scialometria consente di misurare il flusso salivare (patologico se < a 1,5 min /15 minuti), la scialografia di osservare l'architettura e la configurazione del sistema duttale e, infine, la scintigrafia permette una valutazione funzionale delle ghiandole salivari attraverso la velocità di captazione del pertecnato di sodio marcato con Tc 99m (25). Un ausilio per la diagnosi può essere fornito anche dagli esami di laboratorio ed in particolare dalla ricerca degli autoanticorpi anti-Ro/SSA e anti-La/SSB che sono gli unici inclusi nei criteri classificativi internazionali (7). Nell'algoritmo diagnostico, però, la biopsia delle ghiandole salivari minori rappresenta l'indagine "gold standard" ed è universalmente considerata come il criterio più specifico per la diagnosi di SjS (82-95%) (35). La sensibilità dell'esame è più bassa (75-83%) e la percentuale dei falsi negativi è intorno al 20% (36). L'esame viene effettuato praticando una incisione di 1,5-2 cm tra la linea mediana e la commissura della mucosa buccale del labbro inferiore. L'incisione viene effettuata su mucosa integra e le ghiandole prelevate, una volta incluse in formalina, vengono sottoposte all'attenzione del patologo (25). Allo studio istopatologico la ghiandola può mostrare un diverso grado scialoadenite (37, 38). Una scialoadenite aspecifica di grado lieve o moderato non è considerata sufficiente per la diagnosi di SjS, mentre un quadro di scialoadenite focale con almeno un cluster di 50 linfociti per 4 mm² di tessuto (focus) è compatibile con la diagnosi di malattia, anche in accordo con i criteri internazionali (7). Una distribuzione linfocitaria periduttale è inoltre considerata tipica delle forme di SjS primitivo, mentre la distribuzione perivascolare caratterizza prevalentemente le forme di SjS secondaria (38). L'esame istologico delle ghiandole salivari minori non è esente da limiti. Essi sono legati alla sua invasività, all'andamento fluttuante del grado di infiltrazione nelle ghiandole nonché alla necessità di prelevare un campione di tessuto sufficientemente grande considerando la variabilità inter-ghiandolare dell'infiltrato. Un altro limite dell'esame è la riproducibilità del risultato che è in parte

condizionata dall'area ghiandolare esaminata e dalla qualità tecnica del materiale (36). In conclusione, ad oggi non sono stati identificati biomarkers specifici per la diagnosi di SjS, in grado di permettere di formulare ipotesi prognostiche in merito al suo decorso. Anche se la malattia ha un carattere generalmente benigno, tuttavia, considerando il potenziale rischio linfoproliferativo, è auspicabile che possano essere disponibili mezzi diagnostici sempre meno invasivi e più specifici per la SjS.

Ib. SjS: Modificazioni qualitative e quantitative nella composizione della saliva

La SjS, attraverso il sovvertimento strutturale progressivo delle ghiandole salivari e le alterazioni dei processi riassorbitivi e secretivi, determina una riduzione del flusso salivare e può indurre svariate modificazioni della composizione della saliva stessa.

La valutazione quantitativa del flusso salivare viene effettuata, in accordo con i criteri classificativi internazionali, mediante scialometria basale considerando suggestivi di malattia valori uguali o inferiori a 1.5 ml/15 min (7). In realtà, un recente studio olandese ha evidenziato come la riduzione del flusso salivare sia legata, inizialmente, solo ad una riduzione del flusso delle ghiandole sottomandibolari e sottolinguali e come, solo in una fase più avanzata di malattia, si verifichi anche il coinvolgimento delle parotidi (39). In pratica vi sarebbe una progressione temporale nel coinvolgimento delle ghiandole salivari maggiori con l'interessamento, prima, delle sottomandibolari e delle sottolinguali e, dopo, delle parotidi. Lo stesso studio ha confermato come, nella storia naturale della malattia, la composizione della saliva subisca dei cambiamenti con un aumento della concentrazione assoluta del cloro e del sodio e una riduzione dei fosfati. Questi dati confermano studi biochimici precedenti che, fin da metà degli anni '80, hanno iniziato a descrivere come nella saliva dei pazienti con SjS vi fosse un aumento della concentrazione del sodio e del cloro e anche delle proteine totali, dell'albumina, delle IgG e delle IgA (40, 41). Parallelamente, però, è emerso che, anche se la concentrazione assoluta di tali soluti è aumentata, il loro output/minuto è in realtà ridotto e questo dato sarebbe quello in maggior misura responsabile delle alterazioni del cavo orale descritte in corso di malattia (42). Progressivamente, nel tempo, sono state descritte anche ulteriori modifiche a carico della lattoferrina e della beta-2-microglobulina, del lisozima, delle metalloproteinasi MMP-2 e MMP-9 e della callicreina che risulterebbero aumentate, nonché sono state osservate una riduzione nell'attività dell'amilasi e una riduzione del pH salivare (43-47). Gli studi biochimici finora condotti sulla saliva dei pazienti con SjS non sono completamente confrontabili e omogenei. Il principale limite è legato alla difficoltà nel reperire da tutti i pazienti un quantitativo di saliva sufficiente per poter studiare i diversi analiti. Per ovviare ai problemi della raccolta salivare molti studi sono stati condotti su flusso salivare stimolato o selettivamente prelevato da alcune ghiandole, generalmente le parotidi. La stimolazione consente di ovviare al limite del reperimento del campione, tuttavia, l'aumento del flusso può influenzare la concentrazione di alcune proteine che possono risultare ridotte e modificare il pH salivare, aumentandolo. La valutazione del solo flusso

parotideo, inoltre, può fornire risultati parziali in considerazione dell'apparente impegno più tardivo, da parte della malattia, delle parotidi rispetto alle sottomandibolari e alle sottolinguali (39). I parametri oggi ritenuti più sensibili (0.85) e specifici (0.96) sono la combinazione del flusso sottomandibolare e sottolinguale stimolato e la valutazione della concentrazione salivare parotidea del sodio e del cloro (48). Complessivamente, ad oggi, la scialometria e gli studi biochimici condotti sulla saliva risultano in larga parte poco confrontabili, scarsamente riproducibili e di dubbia utilità diagnostica. E' verosimile che la possibilità identificare specifici biomarkers a livello salivare, espressi in maniera diversa nei pazienti rispetto ai controlli, e negli stessi pazienti a seconda dell'attività di malattia, possa consentire di ottenere uno strumento diagnostico non invasivo di indubbia utilità nella cura della SjS; da qui il crescente interesse verso studi di proteomica volti a caratterizzare il profilo proteico della saliva dei pazienti con SjS, valutando simultaneamente un ampio numero di proteine e a partire da minime quantità di fluido salivare dell'ordine di microlitri.

Ic. La proteomica

Il termine “proteomica”, coniato in analogia con il vocabolo genomica nel 1995, indica lo studio di tutte le proteine espresse da un organismo, tessuto o cellula in un preciso istante. (49). Il proteoma è un’entità dinamica perché non solo cellule di uno stesso organismo esprimono proteine differenti, ma anche lo stesso tipo di cellula, in condizioni diverse (età, malattia, ambiente), è caratterizzato da proteine diverse (49). L’analisi diretta delle proteine, rispetto ad un approccio genomico, consente, quindi, di ottenere informazioni precise sui livelli delle proteine presenti, in quel momento, in una cellula o in un fluido biologico rilevandone, inoltre, le possibili modificazioni post-traduzionali (come ad esempio la fosforilazione), che determinano la funzione delle proteine e che risultano particolarmente importanti nella trasduzione del segnale (50, 51).

Negli ultimi anni la proteomica è progredita con crescente interesse nel mondo scientifico e, al momento, è usata come un moderno strumento nella scoperta di farmaci, per la determinazione di processi biochimici implicati nelle malattie, per monitorare processi cellulari, per caratterizzare sia i livelli di espressione che le modifiche post-traduzionali delle proteine, per ricercare differenze tra fluidi biologici o cellule di soggetti sani e malati e per identificare markers di una malattia e possibili candidati per l’intervento terapeutico (52).

Gli studi di proteomica vengono tradizionalmente distinti in tre aree: la *proteomica funzionale* che permette la caratterizzazione dell’attività, delle interazioni e della presenza di modificazioni post-traduzionali delle proteine, per la descrizione a livello molecolare dei meccanismi cellulari; la *proteomica d’espressione* che fornisce la descrizione dell’intero proteoma di una cellula, organismo o tessuto; la *proteomica strutturale* che ha l’obiettivo di identificare e mappare le proteine presenti a livello degli organuli cellulari chiarendone le interazioni reciproche (52).

Le tecnologie proteomiche, a causa della diversità delle proteine, sono le più varie e integrano metodi biologici, chimici ed analitici; la principale tecnologia utilizzata è, però, la spettrometria di massa (MS) che viene associata a metodi differenti di separazione delle proteine (53, 54). La MS è una tecnica altamente sensibile e versatile per lo studio delle proteine e la combinazione della MS, per l’identificazione proteica, con l’elettroforesi bidimensionale (2-DE), come tecnica separativa ad alto potere risolutivo, è il metodo classico e più utilizzato (52).

L'elettroforesi bidimensionale (2-DE) consente di separare, visualizzare, quantificare ed identificare centinaia di proteine a seconda del loro punto isoelettrico e peso molecolare, in un singolo gel, partendo da campioni di complesse miscele proteiche estratte da cellule, tessuti o altri campioni biologici.

La tecnica, introdotta nel 1975, separa le proteine in due step distinti (Fig.1):

1) la 1° dimensione, *Iso-Elettro Focusing (IEF)*, separa le proteine secondo il loro punto isoelettrico (pI).

2) la 2° dimensione, l'*elettroforesi su gel di poliacrilammide (SDS-PAGE)*, separa le proteine secondo il peso molecolare (PM).

Con la 2-DE si possono separare migliaia di proteine, anche quelle che differiscono per un solo amminoacido o per piccole differenze di pI e/o PM, ed ogni spot ottenuto corrisponde ad una singola specie proteica. Per una buona elettroforesi bidimensionale è essenziale un'adeguata preparazione dei campioni: il processo dovrà risultare in una completa solubilizzazione, disaggregazione, denaturazione e riduzione delle proteine del campione. Per la strategia di preparazione dei campioni è importante considerare lo scopo dello studio, infatti step addizionali possono aumentare la qualità del risultato finale, ma portano anche alla perdita di proteine (55).

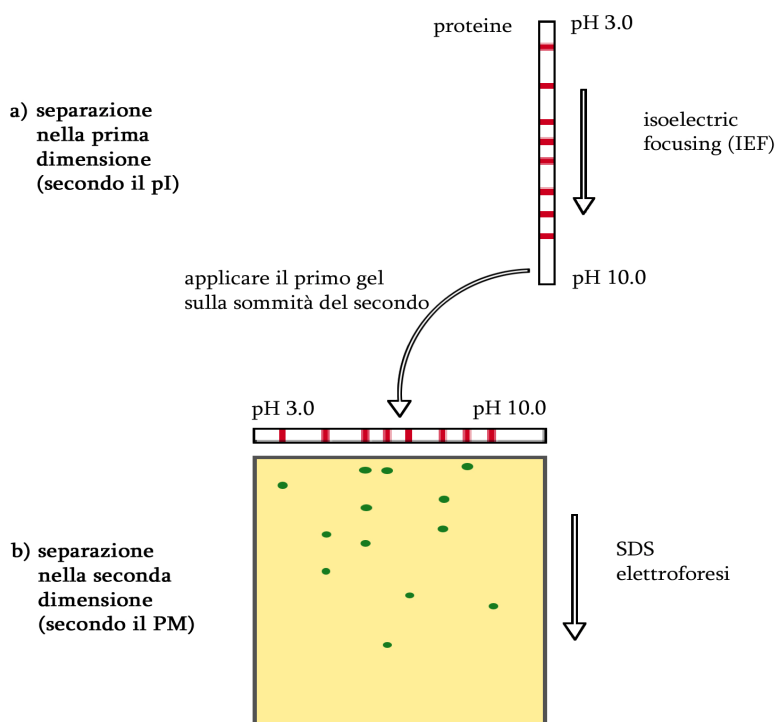


Fig. 1: Elettroforesi bidimensionale.

Prima dimensione

L'IEF è un metodo elettroforetico che separa le proteine secondo il loro punto isoelettrico (pI) utilizzando come supporti delle strip di gel di poliacrilammide. Le proteine sono molecole anfotere: presentano carica netta positiva, negativa o nulla a seconda del pH dell'ambiente in cui si trovano: sono cariche positivamente a pH minori del loro pI e negativamente a pH maggiori. Il punto isoelettrico è il valore di pH al quale la carica netta della proteina è zero. In un gradiente di pH, sotto l'influenza di un campo elettrico, le proteine si muovono fino alla posizione nel gradiente alla quale la loro carica netta è nulla; ad esempio una proteina con carica positiva migrerà verso il catodo, riducendo progressivamente la sua carica positiva, mentre si muove attraverso il gradiente, finché non raggiunge il suo pI. Questo è l'effetto focusing dell'IEF, che concentra le proteine ai loro pI e permette di separarle sulla base di piccole differenze di carica.

La risoluzione del campione è determinata dall'ampiezza del gradiente di pH e dalla forza del campo elettrico. Si utilizzano comunemente voltaggi alti (oltre 1000 V): quando le proteine hanno raggiunto la posizione finale nel gradiente di pH, nel sistema c'è un piccolo movimento ionico che risulta in una corrente finale molto bassa (sotto 1 mA).

L'IEF effettuato in condizioni denaturanti dà la più alta risoluzione ed i risultati migliori.

Originariamente il metodo prevedeva l'utilizzo di tubi di gel di poliacrilammide con gradienti generati da miscele di anfoliti, piccoli polimeri anfoteri che, sotto l'influenza di un campo elettrico, migrano e si allineano secondo i pI, dando un gradiente continuo (Klose J. 1975). A causa delle limitazioni e dei problemi di questi supporti, sono stati sviluppati dei gel a gradiente di pH immobilizzato (IPG), creati incorporando covalentemente un gradiente di gruppi acidi e basici nel gel di poliacrilammide (57). Per le strip sono utilizzate molecole ben caratterizzate, monomeri di acrilammide legati ognuno ad un singolo gruppo basico o acido. Le strip IPG sono prodotte su supporti in plastica usando due soluzioni: una miscela acida ed una basica di monomeri di acrilammide (entrambe contenenti inoltre bisacrilammide e catalizzatori). Le concentrazioni dei gruppi nelle due soluzioni determinano il range di pH del gradiente prodotto (Fig. 2). I gel sono poi lavati, disidratati e tagliati a strisce. In commercio si trovano strip (Amersham Biosciences, Sigma, etc.) di varie lunghezze (7-11-13-18-24 cm) e con vari intervalli di pH (3-10; 4-7; 6-11; 6-9; 3,5-4,5; etc), lineari (L) e non lineari (NL). L'uso delle strip IPG aumenta la riproducibilità e la qualità dei risultati (58).

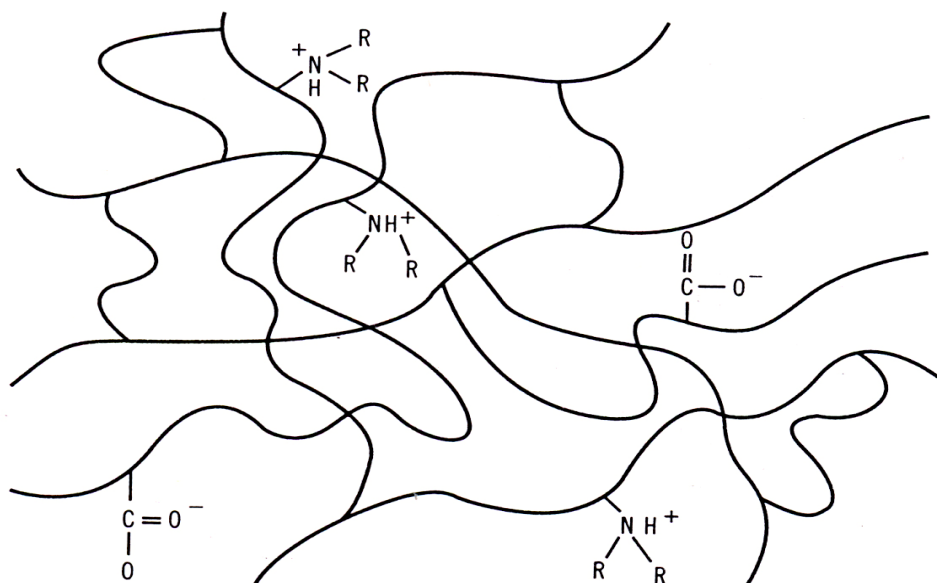


Fig. 2: Rappresentazione grafica della matrice del gel di poliacrilammide con legati i gruppi acidi e basici.

Seconda dimensione

All'IEF segue l'SDS-PAGE, una tecnica elettroforetica che separa i polipeptidi secondo la massa molecolare, utilizzando gel di poliacrilammide. Il sodio dodecil solfato (SDS) è un detergente anionico che in soluzione acquosa stabilizza le molecole proteiche denaturate formando attorno ad esse un guscio di solvatazione (1,4 g SDS/g proteine) che genera micelle dotate della stessa carica elettrica. In questo modo la specifica carica elettrica di una catena polipeptidica viene mascherata dalle cariche negative presenti sulle micelle formate dalle molecole di SDS ed ogni aggregato solubilizzato, proteina-SDS, viene a presentare identica carica negativa per unità di massa. Le particelle anioniche si spostano nel gel di acrilammide, che agisce da setaccio molecolare, separandosi in base al loro peso molecolare mentre migrano in direzione dell'anodo (55).

Per la *visualizzazione dei risultati* possono essere utilizzati molti metodi e le caratteristiche richieste sono: alta sensibilità, ampio range di quantificazione, compatibilità con la spettrometria di massa, bassa tossicità. I metodi più comunemente utilizzati sono il SILVER STAINING o colorazione argentea che è un processo multi-step a vari reagenti molto sensibile (1 ng) o il COOMASSIE STAINING (55). Questo ultimo è circa 50-100 volte meno sensibile (30-50 ng) della colorazione all'argento ma è il solo compatibile con la successiva MS (59).

Le immagini dei gel vengono poi acquisite tramite scanner ed analizzate al computer con software appositi per analizzare complessi campioni proteici separati con l'elettroforesi bidimensionale: un esempio è il software Amersham Biosciences ImageMaster TM 2D Platinum Elite. E' così possibile individuare proteine mancanti o modificate, quantificare gli spot proteici e valutare i cambiamenti nell'espressione proteica in diversi campioni (come controlli vs patologici) (60).

Gli spots proteici di interesse possono essere ulteriormente caratterizzati mediante **spettrometria di massa (MS)**. Uno spettrometro di massa è uno strumento analitico in grado di misurare la massa molecolare di una molecola dopo che essa sia stata ionizzata, ossia dopo che gli sia stata impartita una carica elettrica. Esso è infatti in grado di separare gli ioni molecolari in base al loro rapporto massa/carica. La formazione di ioni di campione in fase gassosa è un prerequisito essenziale per i processi di separazione e di rivelazione tipici di uno spettrometro di massa (61, 62). Esistono molte sorgenti di ionizzazione, ma le più usate nel campo dei peptidi e delle proteine sono la sorgente **MALDI** (matrix-assisted laser desorption/ionization), SELDI (surface enhanced laser desorption/ionization) e la sorgente ESI (elettrospray ionization) (63). La sorgente MALDI, la cui messa a punto risale alla fine degli anni '80, rappresenta una tecnica di ionizzazione "soft" e quindi applicabile a molecole grandi, non volatili o termicamente poco stabili. La tecnica di ionizzazione del MALDI è detta per desorbimento ed è un processo in cui una molecola viene sia evaporata da una superficie che ionizzata. Il campione viene miscelato ad una matrice (di solito acidi organici non volatili, in modo da ottenere un rapporto matrice/campione pari a 10.000:1) e posto, quindi, su un supporto di acciaio dove viene lasciato cristallizzare. La superficie del campione viene bombardata con fotoni ad alta energia derivanti da un raggio laser pulsato (λ 337 nm). L'impatto deposita energia sul campione, direttamente o mediante la matrice, e porta al trasferimento delle molecole campione in fase gassosa ed alla loro ionizzazione. Nel MALDI si assiste ad una ionizzazione per protonazione ossia le molecole catturano protoni caricandosi positivamente (fig 3) (63). La tecnica SELDI, utilizzata a partire dagli anni '90, consente di separare gli analiti in base alla carica di superficie ed è particolarmente utile nell'identificare ioni di bassa massa e di carica basica. Nella ionizzazione per elettronebulizzazione (ESI), infine, gli ioni si formano da soluzioni che vengono finemente nebulizzate attraverso un capillare tenuto ad alto potenziale elettrico. Gli ioni dell'analita, nelle goccioline cariche, vengono volatilizzati in seguito alla rimozione del solvente per

evaporazione e diretti, attraverso un sistema di trasferimento ionico, all'analizzatore di massa (64).

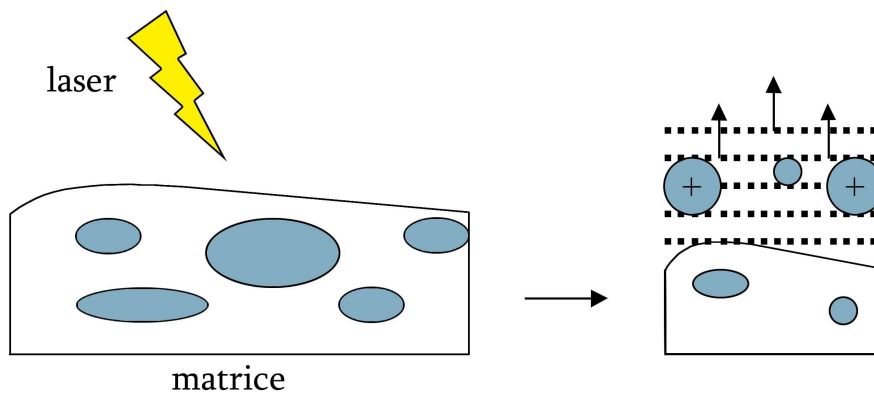


Fig. 3 : MALDI

Una volta ionizzate, le molecole vengono identificate in base al rapporto massa/carica. Il tipo di analizzatore di massa che viene maggiormente usato per l'approccio proteomico classico è il **TOF** (time of flight). Il TOF è essenzialmente costituito da un tubo di lunghezza l nota dove vi è assenza di campo elettrico, ma un'elevata condizione di vuoto. Il vuoto è necessario per permettere agli ioni di raggiungere il detector senza collidere con altre molecole gassose. Queste collisioni potrebbero ridurre la risoluzione e la sensibilità dello strumento e provocare frammentazioni degli stessi ioni. Nel MALDI-TOF un impulso laser desorbe e ionizza le biomolecole. Gli ioni vengono accelerati tramite un voltaggio elevato, acquisendo una velocità che dipende dalla massa: gli ioni leggeri acquisiscono una velocità più elevata rispetto a quelli più pesanti. Entrando in una regione priva di campo elettrico ogni ione mantiene una velocità costante fino a che non raggiunge il rivelatore. Gli ioni di massa differente possono quindi essere separati secondo il tempo: gli ioni più pesanti impiegano più tempo di quelli leggeri. Rilevando il numero degli ioni che arrivano a tempi diversi, è possibile calcolare e visualizzare uno spettro di massa del campione nel quale sono presenti picchi diversi che rappresentano la composizione in ioni con un diverso rapporto massa/carica. Poiché lo stato di carica è solitamente di +1, negli esperimenti di MALDI, è possibile identificare i picchi come rappresentativi delle masse (Fig 4).

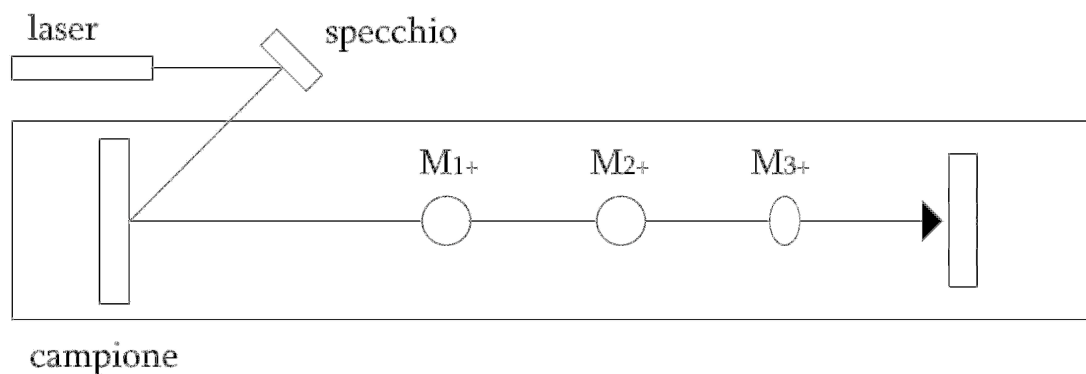


Fig. 4: MALDI-TOF

La MS crea una lista di massa dai peptidi analizzati. Tale lista di massa dei peptidi sconosciuti viene comparata con un database, costituito da proteine note. Comparando la lista di massa dei peptidi della proteina sconosciuta con le liste di massa dei peptidi noti presenti nel database viene effettuata l'identificazione (64) La quantità minima di campione necessaria per l'analisi dipende dalla purezza del campione e di solito è nell'ordine di poche picomoli.

Il vasto range di massa letto, tra 1 e 300 kDa, l'alta accuratezza e la sensibilità rendono il MALDI un metodo d'elezione per l'analisi di tutti i tipi di biomolecole (proteine, acidi nucleici, carboidrati) (65).

In combinazione con l'elettroforesi bidimensionale (e con i database di proteine) il MALDI è particolarmente utilizzato per l'identificazione di spot proteici attraverso 2 approcci principali: la *peptide-mass fingerprinting* (analisi della massa dei digeriti proteolitici) o la *peptide sequencing* (66).

I campioni, di solito, sono separati su un gel e gli spot proteici di interesse sono tagliati e trattati con tripsina, un enzima in grado di rompere i legami peptidici in cui è coinvolto un residuo di arginina o lisina; la miscela di frammenti proteici (peptidi) ottenuta dopo digestione enzimatica è purificata e sottoposta ad analisi di massa. La massa dei peptidi può essere misurata con maggior precisione rispetto a quella delle proteine intatte: i peptidi danno origine ad una library di masse molecolari derivate direttamente dalle proteine, che possono essere identificate con tecniche computazionali e tramite l'utilizzo di database (67). Se la proteina non risulta presente nei database, è possibile ottenere informazioni sulla sequenza dal MALDI con un protocollo di degradazione di Edman modificato: questo è un metodo comune per l'analisi della sequenza delle proteine, che utilizza ripetuti cicli di

rottura dei singoli amminoacidi dal terminale amminico (tramite peptidasi) e successiva identificazione degli amminoacidi staccati con cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC). La miscela di peptidi è analizzata e la sequenza codificata tramite differenze di massa (peptide ladder sequencing) (Fig. 5).

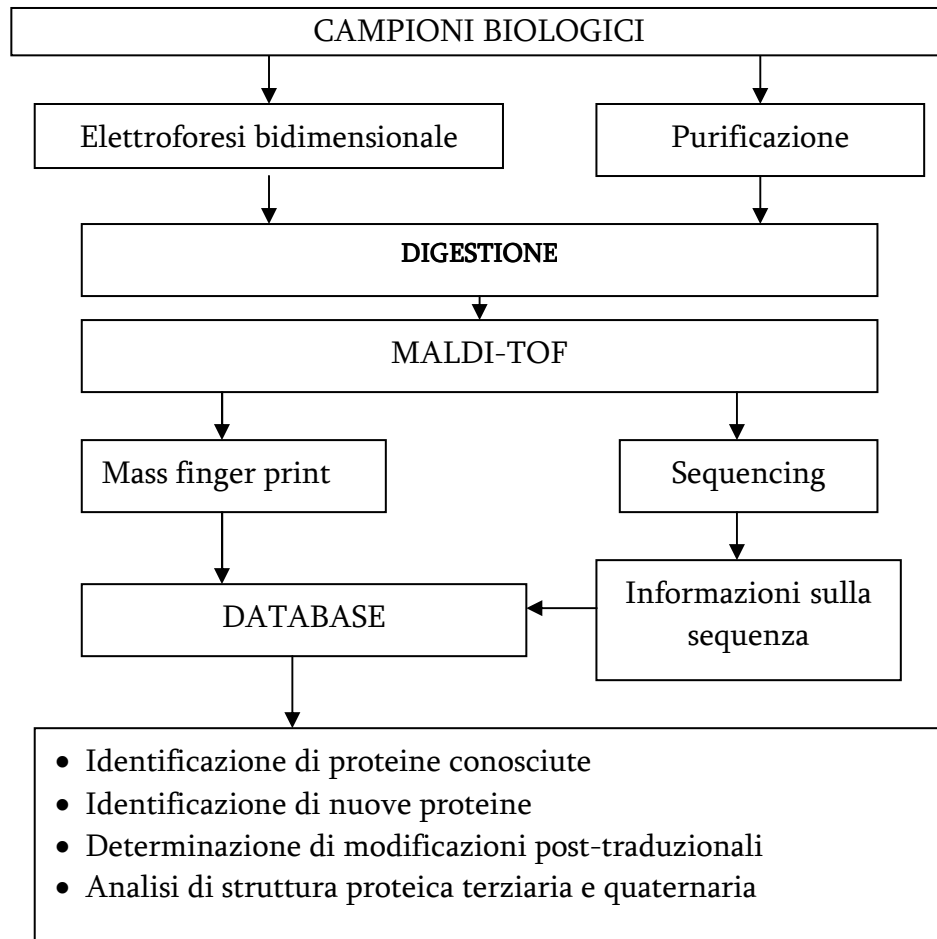


Fig. 5: Schema per l'identificazione di proteine.

Id. Applicazioni cliniche dell'analisi proteomica allo studio della saliva

La saliva in condizioni fisiologiche svolge alcune funzioni fondamentali come: lubrificare e pulire i tessuti orali facilitando il linguaggio, la deglutizione e l'ingestione di cibi; mantenere l'omeostasi nella cavità orale attraverso i tamponi carbonato e fosfato; rimineralizzare i denti con calcio e fosfato; proteggere la superficie dei denti e delle mucose attraverso un'importante azione antimicrobica (lisozima, cistatine, immunoglobuline, lactoferrina, istatine); iniziare la digestione degli amidi grazie all'amilasi salivare (68). La saliva è costituita per il 90% dai fluidi secreti dalle ghiandole salivari maggiori (parotidi, sottomandibolari, sottolinguali) e minori (si trovano nel labbro inferiore, lingua, palato, guance e faringe) e per un 10% è rappresentata dal fluido gengivale crevicolare. La sua composizione è caratterizzata principalmente da acqua (99%), elettroliti ma anche proteine di varia natura (enzimi, mucine, immunoglobuline) (68).

L'analisi della saliva, rispetto ad altri fluidi biologici, offre alcuni vantaggi come il fatto che possa essere raccolta in modo non invasivo da personale con preparazione limitata e senza particolari attrezzature, facilmente anche da pazienti meno collaboranti (bambini, anziani, insufficienti mentali) e che possa fornire un approccio poco costoso per lo screening di grandi popolazioni. I limiti dell'analisi salivare sono, viceversa, rappresentati dall'alta concentrazione di mucine, di residui e di batteri nonché dalla sua alta attività proteolitica (69). La raccolta di saliva direttamente dalle ghiandole che la producono può essere utile per individuare patologie specifiche delle ghiandole, ma oggi, sempre più frequentemente, nella diagnosi delle malattie sistemiche, è la saliva presente nel cavo orale che viene più frequentemente utilizzata; tale utilizzo è in larga parte giustificato dal fatto che la saliva del cavo orale contiene alcuni costituenti del siero che raggiungono le ghiandole salivari per diffusione passiva, per ultrafiltrazione attraverso le giunzioni intracellulari o attraverso il flusso del fluido gengivale (70). Certamente i livelli di certi costituenti serici nella saliva non sono sempre un riflesso dei livelli di questi markers nel siero, ma c'è un crescente interesse nell'uso della saliva e soprattutto nello studio delle proteine salivari per scopi diagnostici, specie nel caso di malattie sistemiche ereditarie, autoimmuni, infettive, nelle neoplasie del cavo orale e per le malattie virali, nonché anche per monitorare i livelli di farmaci, sostanze d'abuso ed ormoni (70, 71). In questo senso, è stato ipotizzato che nella fibrosi cistica, ad esempio, l'antigene carcinoembrionario o la glicosilazione di alcune mucine salivari possano fungere da biomarkers di malattia mentre,

nei pazienti con diabete mellito, la concentrazione salivare di amilasi e IgA salivari risultino aumentate (72).

Negli ultimi cinque anni la ricerca dei biomarkers salivari di malattia è stata potenziata grazie alla tecnologia proteomica che ha permesso di mappare le proteine presenti nella saliva dei soggetti sani analizzando sia il fluido salivare in toto (69, 72-74) che la pellicola salivare adesa ai denti (75), il fluido creviculare (76) e, infine, anche i secreti ghiandolari selettivamente prelevati dalle parotidi, dalle sottomandibolari e dalle sottolinguali (77,78). Il confronto tra il pattern proteico salivare dei soggetti sani e dei malati sta consentendo di rilevare livelli di proteine specifiche che potrebbero essere usati come biomarkers di malattia. E' possibile ipotizzare, con tale approccio, di poter fornire anche informazioni riguardo variazioni semiquantitative sui livelli specifici di ciascuna proteina e rilevare la presenza di isoforme dovute a modificazioni post-traduzionali come fosforilazioni e glicosilazioni. Analisi in questo senso sono già state effettuate per il lichen planus, per alcune neoplasie del cavo orale e della testa e sono in corso per numerose malattie sistemiche (79, 80). Un lavoro preliminare è stato recentemente pubblicato anche per la SjS ma limitatamente all'analisi del secreto parotideo stimolato (81). Questo lavoro, che si colloca nel più ampio panorama delle recenti applicazioni della proteomica allo studio delle malattie reumatiche (Tabella 3), ha messo in luce importanti differenze qualitative e quantitative nei pazienti con SjS evidenziando, in particolare, la riduzione dell'amilasi e della carbonato deidrogenasi e l'aumento dei livelli di alcune proteine come la beta-2-microglobulina, il lisozima C, la cistatina C, la catena immunoglobulinica leggera Igk e il recettore polimerico delle IgG. Alla luce dei risultati incoraggianti finora ottenuti, lo studio delle proteine salivari sembra poter aprire nuovi sbocchi e nuove potenzialità per la ricerca sulle malattie reumatiche, specie nel caso di malattie come la SjS che colpiscono elettivamente le ghiandole salivari.

Tabella 3: *Analisi Proteomica in Reumatologia*

| Malattia | Autore | Materiali |
|---|--------------------------------|---------------------------|
| Osteoartrite | Hermansson M. et al. 2004 (82) | Cartilagine patologica |
| Osteoartrite | De Ceuninck F et al. 2005 (83) | Cartilagine patologica |
| Osteoartrite | Ruiz-Romero C et al. 2005 (84) | Cartilagine patologica |
| Artrite Reumatoide | Sinz A. et al. 2002 (85) | Siero, liquido sinoviale |
| Artrite Reumatoide | Liao H. et al. 2004 (86) | Siero, liquido sinoviale |
| Artrite Reumatoide | Drynda S et al. 2004 (87) | Siero, liquido sinoviale |
| Artrite Reumatoide | de Seny D et al. 2005 (88) | Siero |
| Artrite Reumatoide | An Y et al. 2005 (89) | Siero |
| Artrite Reumatoide, Spondiloartrite, Osteoartrite | Tilleman K et al. 2005 (90) | Sinovia |
| Artrite cronica giovanile | Miyamae T et al. 2005 (91) | Siero |
| Sindrome di Sjogren | Tomosugi N. et al. 2005 (92) | Lacrime |
| Sindrome di Sjogren | Ryu O. et al. 2006 (81) | Saliva (flusso parotideo) |
| Granulomatosi di Wegener | Stone JH. et al. 2005 (93) | Siero |
| Sclerodermia | Fietta A. et al. 2006 (94) | Liquido broncoalveolare |

II. SCOPO DEL LAVORO

Lo scopo di questa tesi è stato quello di caratterizzare il pattern proteico della saliva di pazienti con SjS primitiva utilizzando la tecnologia proteomica. Per lo studio è stato scelto di analizzare il proteoma salivare, inteso come il completo set di proteine presenti nella cavità orale in un dato momento, combinando l'elettroforesi bidimensionale con la spettrometria di massa MALDI-TOF. La scelta della saliva è stata effettuata in relazione al caratteristico impegno clinico delle ghiandole salivari nella SjS, e considerando anche il crescente interesse per la saliva come strumento diagnostico in molte malattie sistemiche; essa, infatti, si configura come un fluido biologico più facilmente reperibile rispetto al siero e con una minore complessità in termini di numero di proteine e variabilità.

I risultati ottenuti sono stati confrontati, in primis, con soggetti sani che presentassero caratteristiche comparabili per sesso e per età.

Successivamente, la popolazione di controllo è stata allargata ad un gruppo di controllo "patologico" eterogeneo con finalità comparative diverse. Sono stati inclusi, allora, nello studio soggetti con xerostomia idiopatica, non affetti da SjS, allo scopo di valutare quali modificazioni del profilo proteico potessero rispecchiare più da vicino le modificazioni del cavo orale imputabili alla secchezza della mucosa orale di per sé. Sono poi stati studiati pazienti con profilo auto-anticorpale analogo ai soggetti con SjS e, nella fattispecie con anticorpi anti-Ro/SSA e anticorpi anti-Ro/SSA + anti-La/SSB, ma non affetti da xerostomia, allo scopo di valutare se esistessero eventuali correlazioni tra il profilo auto-anticorpale e le modificazioni nei livelli di proteine espresse. Infine, sono stati considerati pazienti affetti da un'altra malattia immunomediata capace di coinvolgere, anche se con meccanismi diversi, le ghiandole salivari: la Sclerodermia. La Sclerodermia è una connettivite sistemica, a patogenesi autoimmune, caratterizzata da una progressiva fibrosi che coinvolge la cute e gli organi interni (polmone, tratto gastroenterico, rene, cuore) (95). La malattia è provocata da una incontrollata proliferazione del tessuto connettivo e della matrice extracellulare ad opera dei fibroblasti cui si associano alterazioni vascolari localizzate soprattutto a livello del circolo arterioso più periferico (96, 97). Nella storia naturale della malattia è descritto un potenziale coinvolgimento delle ghiandole salivari di tipo fibrotico direttamente legato alla malattia. L'analisi di tipo istopatologico delle ghiandole salivari di pazienti con Sclerodermia ha, infatti, documentato un aumento del numero delle mast-cellule tissutali nonché un incremento nell'espressione delle isoforme del TGFβ2 e β3 a livello dei fibroblasti ghiandolari; elementi cellulari entrambi coinvolti nei

processi fibrotici (98). Poiché la Sclerodermia può, tuttavia, presentarsi in associazione alla SjS (95) ed è possibile, in questo caso, che i pazienti presentino un coinvolgimento delle ghiandole salivari legato alla sindrome di Sjogren secondaria, nello studio questo ultimo gruppo di pazienti è stato escluso. In conclusione, il gruppo di controllo patologico è risultato costituito da:

- a. soggetti con xerostomia idiopatica
- b. soggetti affetti da Sclerodermia
- c. soggetti asintomatici con anti-Ro/SSA
- d. soggetti asintomatici con anti-Ro/SSA e anti-La/SSB

Il confronto dei patterns proteici tra i diversi subset di soggetti arruolati nello studio ha avuto come obiettivo principale quello di evidenziare le alterazioni qualitative e quantitative peculiari solo dei pazienti con diagnosi di SjS primitiva, nel tentativo di isolare biomarkers specifici di malattia che avessero una potenziale valenza diagnostica per la SjS primitiva. Nell'ambito degli obiettivi secondari si è cercato di giustificare tali alterazioni alla luce delle più recenti acquisizioni eziopatogenetiche e cliniche disponibili per la malattia.

III. MATERIALI E METODI

IIIa. Pazienti

Nello studio sono stati arruolati 15 pazienti di sesso femminile ed età media $49,38 \pm 12,54$ ($M \pm DS$), affette da SjS primitiva e seguite presso l'U.O di Reumatologia dell'Università di Pisa. La diagnosi è stata formulata, nella totalità dei casi, in accordo con i più recenti Criteri Americani ed Europei per la malattia (7). La sintomatologia soggettiva dei pazienti, relativa alla secchezza oculare e all'impegno delle ghiandole salivari, è stata raccolta mediante apposito questionario validato. Per l'obiettivazione della secchezza oculare sono stati eseguiti nella totalità dei casi test di Schirmer e Rosa Bengala (o verde di lissamina) ed in tutti i casi sono stati determinati il profilo bio-umorale (comprensivo dell'elettroforesi proteica) e la ricerca degli autoanticorpi non organo specifici. In particolare, la ricerca degli anticorpi antinucleari, degli anti-Ro/SSA e anti-La/SSB e del fattore reumatoide è stata effettuata, rispettivamente, mediante immunofluorescenza su Hep2, contro-immunoelettroforesi e nefelometria. Infine, i soggetti sono stati sottoposti a biopsia delle ghiandole salivari minori la cui lettura è stata effettuata secondo il grading di Chisolm e Mason (99). Le caratteristiche cliniche e sierologiche delle pazienti sono riassunte nella tabella 4. In tutti i pazienti è stata esclusa un'infezione da virus HBV and HCV, virus scialotropi in grado di determinare una flogosi ghiandolare.

Il gruppo di controllo di soggetti sani è risultato costituito da 15 soggetti sani comparabili per sesso e per età con i pazienti arruolati ($45,83 \pm 17,38$; $M \pm DS$). Lo studio è poi stato allargato a 6 soggetti con sindrome secca idiopatica ($65,16 \pm 6,24$; $M \pm DS$), 6 pazienti con anticorpi anti-Ro/SSA ($38,4 \pm 9,45$; $M \pm DS$), 3 con anti-Ro/SSA ed anti-La SSB positivi senza sindrome secca ($42,33 \pm 7,63$; $M \pm DS$) e 15 pazienti con Sclerodermia diffusa e profilo autoanticorpale omogeneo positivo per anti-Scl 70 (età media $49,5 \pm 10$) ($M \pm DS$). La definizione di sindrome secca idiopatica è stata attribuita a soggetti con xerostomia apparentemente non attribuibile alle più comuni cause virologiche o farmacologiche, con profilo auto-anticorpale negativo e biopsia delle ghiandole salivari con grading di Chisolm Mason ≤ 2 . Nei soggetti asintomatici carrier di autoanticorpi la positività degli autoanticorpi anti Ro/SSA e anti La/SSB è stata confermata in almeno due successive determinazioni. La diagnosi di Sclerodermia, infine, è stata definita in accordo con i criteri classificativi internazionali (100). Sono stati esclusi dallo studio soggetti fumatori. Per l'inclusione nello studio tutti i partecipanti hanno rilasciato un consenso informato.

Tabella 4. *Caratteristiche clinico-sierologiche dei pazienti con SjS in studio*

| Caratteristica | Percentuale |
|---|--------------------|
| Xerostomia | 100% |
| Xeroftalmia | 100% |
| Test oculari (Schirmer o Rosa Bengala) | 100% |
| Uso quotidiano lacrime artificiali | 100% |
| Sensazione di sabbia negli occhi | 75% |
| Necessità di bere frequentemente nella giornata | 50% |
| Tumefazione ghiandole salivari maggiori | 15% |
| Biopsia ghiandole salivari positiva | 80% |
| FAN Hep2 > 1:160 | 85% |
| Anti-Ro/SSA | 75% |
| Anti-La/SSB | 25% |
| Ra test | 60% |
| Ipergammaglobulinemia | 80% |

IIIb. Materiali e Strumentazione

L'acqua, di grado analitico, è stata filtrata mediante l'apparecchio MilliQ (PS Whatman®, Millipore Corporation, Maid Stone, England).

Tutti i reagenti e i solventi sono stati acquistati dalle più comuni fonti commerciali.

Sono state utilizzate strip Immobiline™ DryStrip pH 3-10 L, di 18 cm, e le Ettan™ IPGphor™ Strip Holder, in ceramica, dell'Amersham Biosciences (Uppsala, Sweden).

L'apparecchio impiegato per l'isoelettrofocalizzazione è stato l'Ettan™ IPGphor™ Isoelectric Focusing System (Amersham Bioscience). Per fare i gel è stato utilizzato il Protean Plus Multicasting Chamber (Biorad).

L'apparecchio per l'elettroforesi usato è il Protean II XL Ready Gel (Biorad) con alimentatore EPS 601 Power Sully (Amersham Bioscience).

IIIc. Raccolta e preparazione del campione

I campioni di saliva dei soggetti sono raccolti tramite sputo, senza stimolazione chimica, al mattino e a digiuno. Per minimizzare la degradazione proteica, i campioni sono stati mantenuti in ghiaccio e trattati immediatamente. Da ogni soggetto sono stati ottenuti 1-2,5 ml di saliva che sono stati centrifugati a 14000 g per 20 minuti a 4°C per rimuovere materiale insolubile e cellule.

Nella preparazione il campione di saliva (già centrifugato per eliminare il materiale insolubile) viene addizionato ad acido tricloroacetico (TCA) al 20% e ditiotreitolo (DTT) allo 0,1% (1 ml di TCA per 1 ml di saliva: concentrazioni finali TCA 10% e DTT 0,05%) e le proteine vengono lasciate precipitare in ghiaccio per 30 minuti. Al termine del periodo di incubazione la sospensione è centrifugata a 14000 g per 10 minuti a 4°C. Il sovrantante viene eliminato, mentre il pellet ottenuto è risospeso con ultraturax in 2 ml di acetone a 4°C, quindi centrifugato a 14000 g per 15 minuti. Questa operazione di lavaggio con acetone freddo viene ripetuta altre due volte al fine di eliminare il TCA. Gli eventuali residui di acetone sono eliminati tramite evaporazione ed il pellet finale, che contiene le proteine presenti nella saliva, viene processato per effettuare la prima dimensione. Il pellet proteico è risospeso nella soluzione di reidratazione. La soluzione di reidratazione utilizzata è composta da:

Urea 7M – Thiourea 2M: servono per solubilizzare e denaturare le proteine così che siano presenti in una sola configurazione;

Chaps 4%: è un detergente non ionico che permette di solubilizzare le proteine idrofobiche e minimizzare l'aggregazione proteica;

Ditiotreitolo (DTT) 60mM: agente riducente, serve per rompere ogni ponte disolfuro e permettere alle proteine di distendersi completamente;

Blu di Bromofenolo 0,002%: per seguire la corsa, se il tracciante non migra all'anodo non c'è flusso di corrente;

Anfoliti (3-10) 0,5%: aumentano la solubilità delle proteine minimizzando la loro aggregazione dovuta ad interazioni carica-carica.

I campioni devono rimanere in tale soluzione 30 minuti, a temperatura ambiente, per ottenere una completa denaturazione e solubilizzazione. Una piccola aliquota del campione viene utilizzata per la determinazione della concentrazione proteica tramite il metodo RC/DC della Biorad (Peterson GL.), il volume restante viene utilizzato per la prima dimensione. Per i gel analitici le aliquote contengono 150 µg di proteine e vengono portate sino ad un volume finale di 350 µl con la soluzione di reidratazione. A questo punto i campioni possono essere utilizzati per la prima dimensione o congelati a -80°C ma in tal caso gli anfoliti sono omessi e vengono addizionati solo al momento della prima dimensione.

Dosaggio proteico RC/DC/BIORAD

Il DC protein assay è un dosaggio colorimetrico con cui viene costruita una curva di riferimento utilizzando una proteina standard che dovrà essere preparata nello stesso tampone del campione proteico di interesse. In questo caso la proteina standard albumina bovina, è risospesa nella soluzione di reidratazione. Vengono preparate quattro concentrazioni (con un volume di 25 µl) di proteina standard (0.2-0.4-0.8-1.5 mg/ml) che abbracciano l'intervallo di sensibilità del metodo (Tab.5).

Tabella 5. *Diluizioni della BSA per la retta di taratura.*

| | Rehydration | BSA | Concentrazione | µg BSA |
|--------|-------------|---------|----------------|--------|
| Bianco | 25µl | - | 0 µg/µl | 0 µg |
| 1 | 21,7µl | 3,3µl | 0,2 µg/µl | 4 µg |
| 2 | 18,3µl | 6,7µl | 0,4 µg/µl | 8 µg |
| 3 | 11,7 µl | 13,3 µl | 0,8 µg/µl | 16 µg |
| 4 | - | 25 µl | 1,5 µg/µl | 30 µg |

Per il dosaggio proteico del campione incognito si procede con una diluizione 1:10 o 1:5 dello stesso (si valuta sulla base del volume di soluzione scelto per la risospensione del campione) con la soluzione di reidratazione per avere un volume finale di 25 µl.

Il dosaggio viene effettuato in eppendorfs, in doppio; come bianco viene dosata la soluzione di reidratazione, a temperatura ambiente.

Agli standars ed ai campioni così preparati sono aggiunti 125 µl di reagente I, agitati su vortex, e incubati 1 minuto. Quindi vengono addizionati 125 µl di reagente II, agitati su vortex e centrifugati a 12000 g per 5 minuti. I sovrantanti sono scartati, e questo primo step è ripetuto variando i volumi di reagente I (125 µl) e II (40µl). Sono quindi addizionati 127 µl di reagente A* per ciascuna eppendorf, agitato e incubato per 5 min o finchè il precipitato non è completamente disciolto. Si addiziona infine 1 ml di reagente B in ciascuna eppendorf agitando immediatamente e si lascia in incubazione per 15 minuti. Al termine del periodo di incubazione si procede alla lettura dei campioni alla lunghezza d'onda di 750 nm.

Si costruisce una retta di taratura nell'intervallo di sensibilità da 5 µg a 37.5 µg: $y=Ax$, e dall'equazione della retta si procede al calcolo della concentrazione proteica per il campione incognito.

$$\frac{(\text{lettura campione} - \text{lettura bianco})}{\text{assorbanza}} \times \text{fattore diluizione} = \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$$

IIIId. Elettroforesi Bidimensionale

Isoelettrofocalizzazione

La prima dimensione è effettuata su strip di 18 cm in cui è presente un gradiente lineare di pH 3-10 (Amersham Biosciences).

-Il volume caricabile su una strip da 18 cm è di 350 µl.

-Il volume del campione deve essere < al 25% del volume totale.

-Al momento vengono aggiunti 0,5% di anfoliti.

Si caricano su strip holder i 350 µl del campione (pari a 150 µg di proteine); si pone sopra l'IPG strip e si copre con l'IPG Cover Fluid (Amersham Biosciences), un olio minerale che minimizza l'evaporazione e la cristallizzazione dell'urea, prima di chiudere con l'apposito coperchietto.

Per la prima dimensione è utilizzato l'Apparecchio IPGphor (Amersham Biosciences) che permette di impostare reidratazione e IEF del campione contemporaneamente (Tabella 6). Il programma utilizzato come tempi e voltaggio applicati è sotto elencato e arriva a permettere di ottenere fino ad ottenere 70000 V totali:

Tabella 6. *Ettan IPGphor Isoelectric Focusing System.*

| | | | |
|---------------|-----|-------|------|
| reidratazione | 1h | 0V | 16°C |
| I step | 10h | 30V | 16°C |
| II step | 1h | 200V | 16°C |
| III step | 30' | 300V | 16°C |
| IV step | 3h | 3500V | 16°C |
| V step | 10' | 5000V | 16°C |
| Vi step | 12h | 8000V | 16°C |

Gli alti voltaggi raggiunti richiedono un controllo della temperatura che infatti è mantenuta a 16°C per tutta la corsa. Inoltre, dopo la reidratazione delle strip, vengono inseriti sugli elettrodi dei quadratini di una apposita carta per isoelettrofocusing (electrode pads). Tali pads vengono inumiditi con acqua MilliQ e posti tra la strip e gli elettrodi per preservare questi ultimi dalla precipitazione degli ioni.

Al termine della IEF la strip viene ripulita dall'eccesso di olio minerale e utilizzata subito per la seconda dimensione o conservata a -20 °C.

Equilibratura

Prima di effettuare la seconda dimensione la strip viene equilibrata incubandola, in successione, con:

- 1) 10 ml di SDS Equilibration Buffer + DTT 1% per 15 minuti in agitazione a temperatura ambiente;
- 2) 10 ml di SDS Equilibration Buffer + IAA 2,5% per 15 minuti in agitazione a temperatura ambiente;

L' SDS equilibration buffer contiene:

Tampone equilibrante (Tris-HCl 50 mM pH 8,8): per mantenere le strip in un range di pH appropriato per l'elettroforesi;

Urea (6 M) *Glicerolo* (30%): per ridurre l'elettroosmosi e migliorare il trasferimento delle proteine alla seconda dimensione. L'elettroosmosi è dovuta alla presenza di cariche fisse sulla strip all'interno di un campo elettrico e può interferire con il trasferimento delle proteine dalla strip al gel della seconda dimensione;

Sodio dodecil solfato (2%): denatura le proteine e forma complessi proteine-SDS carichi negativamente. La quantità di SDS legato ad una proteina, e quindi la carica negativa, è direttamente proporzionale alla massa della proteina, in questo modo l'elettroforesi separerà le proteine in base al loro peso molecolare;

Blu di Bromofenolo (0,002%): usato come agente tracciante per seguire la corsa elettroforetica;

Ditiotreitolo (1%): agente riducente per preservare lo stato ridotto delle proteine;

Iodoacetammide (2,5%; al 2° lavaggio): per alchilare i gruppi tiolici delle proteine e prevenirne la riossidazione durante l'elettroforesi.

Seconda Dimensione

La strip viene posta sopra un gel di poliacrilammide 12% (20cm×20cm×1,5mm), facendo bene attenzione che aderisca in tutta la sua lunghezza al gel, e bloccata con una soluzione di agarosio 0.1% in Running Buffer.

L'elettroforesi è effettuata in due step: per i primi 15 minuti si impostano 15 mA per gel aumentando poi la corrente a 40 mA per gel finchè il fronte del campione, visualizzato tramite il Blu di bromofenolo, esce dal fondo di corsa (circa 5:30 ore).

Per la corsa elettroforetica si utilizza il RUNNING BUFFER 10X (Tris-base 25mM, Glicina 192 mM, SDS 0.1%) diluito 1:10; la diluizione viene fatta il giorno precedente per mantenere il tampone a 4°C e poterlo utilizzare freddo.

Preparazione Del Gel 12% Nel Multicasting

Al fine di minimizzare la variabilità sperimentale e quindi aumentare la riproducibilità, i gel di acrilammide (12%) vengono preparati contemporaneamente (fino ad 8 gel-Tabella 7) utilizzando l'apparecchio Multicasting della Biorad e la corsa è condotta su di un apparecchio Protean II XI Multi-cell 2D in grado di ospitare e far correre contemporaneamente fino a 6 gel in condizioni termostatate (circa 10°C).

Tabella 7. Volumi per 6 ed 8 gel di acrilammide al 12%.

| | 6 gel | 8 gel |
|---------------------------------|----------|----------|
| H ₂ O milliQ | 142.8 ml | 190.4 ml |
| Tampone Tris 1.5M pH8.8 | 105 ml | 140 ml |
| Acrilammide/bis-acrilammide 30% | 168 ml | 224 ml |
| Ammonio persolfato 10% | 2.1 ml | 2.8 ml |
| Temed | 105 µl | 140 µl |

Colorazione dei gel

I gel bidimensionali così ottenuti sono stati colorati utilizzando una colorazione all'argento/ammoniaca.

Alla fine della seconda dimensione, il gel viene rimosso dai vetri ed è lavato con acqua deionizzata per 5 min, quindi lasciato in etanolo:acido acetico:acqua (40:10:50) per un'ora, e successivamente in etanolo:acido acetico:acqua (5:5:90) per tutta la notte. All'indomani il gel viene sottoposto ad un processo multi-step:

- Viene lavato per 5 min con acqua deionizzata;
- Si lascia per 30 min in una soluzione di 1% glutaraldeide e 0,5M sodio acetato;
- Si lava 3x10 min con acqua deionizzata;
- Viene incubato 2x30 min con una soluzione di acido 2,7-naftalene disulfonico 0,05%;
- Al termine di questo periodo di incubazione il gel è nuovamente lavato 4x15 min con acqua deionizzata;
- Viene quindi colorato in una soluzione fresca di nitrato di argento 2,5% e ammoniaca 30% per 30 min;
- Dopo la colorazione, il gel è lavato con acqua deionizzata 4x4 min e sviluppato in soluzione di acido citrico 0,01% e formaldeide 0,1% per 3:40 min;
- La reazione è stoppata con una soluzione di Tris 5% e acido acetico al 2%.

Tutte gli steps della colorazione sono condotti a temperatura ambiente e sotto agitazione, inoltre i tempi di sviluppo sono mantenuti costanti per tutti i gel per poter fare confronti quantitativi oltre che qualitativi tra gel differenti.

Gel Preparativi

Per l'identificazione delle proteine d'interesse occorre estrarre queste ultime dal gel perché possano poi essere sequenziate tramite spettrometria di massa MALDI-TOF; la colorazione all'argento utilizzata non risulta però compatibile con la spettrometria di massa, pertanto occorre realizzare gel preparativi che saranno colorati con il Coomassie Colloidale; una colorazione meno sensibile di quella all'argento.

Questa procedura richiede quindi di caricare un quantitativo maggiore di proteine, nel nostro caso abbiamo caricato 1500 µg.

Prima dimensione

Per i gel preparativi si carica un volume di campione pari a 1500 µg e si arriva ad un volume finale di 400 µl con la soluzione di reidratazione. Si utilizzano sempre strip da 18 cm con un gradiente lineare di pH 3-10 e si aggiungono al momento 0,5% di anfoliti.

Cambia il programma utilizzato (Tabella 8):

Tabella 8. *Isoelettrofocusing per gel preparativi*

| | | | |
|---------------|------|-------|------|
| reidratazione | 1h | 0V | 16°C |
| I step | 12 h | 30V | 16°C |
| II step | 11h | 200V | 16°C |
| III step | 2 h | 300V | 16°C |
| IV step | 3h | 3500V | 16°C |
| V step | 3h | 3500V | 16°C |
| VI step | 15 h | 5000V | 16°C |

Seconda dimensione e colorazione

La procedura della seconda dimensione è analoga a quella utilizzata per i gel analitici ma per la colorazione si utilizza il Coomassie Brilliant Blue G-Colloidal che, a differenza della colorazione all'argento, è compatibile con la spettrometria di massa. Il *Coomassie Colloidale* contiene:

0,12% Coomassie Brilliant Blue G-250

10% Ammonio solfato

2% Acido fosforico.

Il colorante così preparato deve essere diluito al momento dell'utilizzo con il metanolo (4 parti di colorante per 1 di metanolo) agitando per 30 secondi. La colorazione prevede pochi passaggi:

- Terminata la corsa, il gel viene lasciato per un'ora, in agitazione, nella soluzione di fissaggio contenente il 7% di acido acetico ed il 40% di metanolo;
- Il gel è messo in incubazione nel colorante dalle 2 alle 12 ore;
- Si sostituisce il colorante con una soluzione di acido acetico (10%) e metanolo (25%) mantenendo il gel in agitazione, a temperatura ambiente, per 60 secondi;
- Si cambia la soluzione con un'altra di metanolo (25%), sempre agitando il gel, sostituendola dopo pochi secondi con una nuova di metanolo (25%) che può essere lasciata fino a 24 ore.

Analisi dei Gel Tramite Image Master 2D Platinum

Le immagini dei gel sono state acquisite tramite uno scanner (Epson Expression 1680) e analizzate con il programma Image Master 2D Platinum 5.0 dell'Amersham Bioscience. Tramite software si possono mettere a confronto i gel ottenuti dall'elettroforesi bidimensionale della saliva. Gli spots proteici di ciascun gel sono selezionati, numerati e confrontati (sovrapposti). I gel sono divisi nelle diverse classi in modo che il programma sia poi in grado di effettuare un confronto tra i gel all'interno della stessa classe e tra classi diverse. Il programma permette, infatti, di evidenziare eventuali variazioni nell'entità e/o nella presenza o assenza di determinate proteine. Dopo la messa in evidenza degli spot nei gel, sempre mediante software vengono generati dei gel sintetici uno per ciascuno dei gruppi di soggetti di volta in volta esaminati. Ciascuno dei gel sintetici contiene esclusivamente gli spot comuni a tutti i singoli gel del gruppo in esame ovvero solo gli spot espressi nella totalità dei gel del gruppo di soggetti in esame può entrare a far parte del gel sintetico. La finalità dei gel sintetici è stata quella di isolare un numero definito di proteine di interesse che sono state poi caratterizzate mediante spettrometria di massa. La valutazione quantitativa della densità ottica delle proteine nei diversi gruppi di soggetti in studio è, invece, stata valutata mediante il confronto delle medie dei singoli valori ottenute considerando gli spots proteici dei singoli gel di ciascun gruppo.

IIIe. MALDI-TOF

Preparazione dei campioni per MALDI-TOF

Gli spots proteici di interesse sono tagliati dal gel utilizzando per la digestione la tripsina seguendo la seguente procedura:

- i gel ottenuti mediante 2-DE vengono trattati con bicarbonato di ammonio 50mM e acetone (AcN) 30% per 30' a temperatura ambiente
- i gel vengono disidratati per 30' in una centrifuga Hetovac (HETO, Allerod, Denmark) e quindi reidratati per 45' a 4°C in 5-20 µl di una soluzione 50 mM di bicarbonato di ammonio contenente tripsina a 6.25 ng/ µl
- Dopo il periodo di incubazione di una notte, i gel vengono disidratati in centrifuga, reidratati con 20 µl di H₂O e alla fine disidratati di nuovo
- L'eluizione dei peptidi viene effettuata con 20 µl di acido trifluoroacetico (TFA) all'0.1% per 20' a temperatura ambiente
- La soluzione di TFA contenente le proteine di è trasferita in un tubo di propilene
- Una seconda eluizione dei peptidi viene effettuata con 20 µl di TFA allo 0'1% in 50% AcN per 20' a temperatura ambiente
- Le due eluizioni vengono poste insieme e il volume complessivo viene ridotto di 1-2 µl per evaporazione
- Estrazioni di controllo vengono effettuate utilizzando parti dei gel privi di proteine
- Gli spots sono così inviati al Core Facility Proteomic (Università di Ginevra) per l'analisi spettrometrica che consente di identificare le proteine.

Identificazione proteica mediante finger printing (MALDI-TOF)

Prima del finger printing, le soluzioni contenenti i peptidi vengono addizionate con TFA allo 0.1% in 50% AcN e portate ad un volume di 5 µl. Un microlitro di ciascun campione viene depositato su una piastra 2 x 96 della MALDI e portato a secco sottovuoto. Viene aggiunto un ugual volume di matrice (10 mg/ml α-cyano-4-hydroxycinnamic acid in 50% AcN, 0.1% TFA). I campioni vengono portati a secco sottovuoto nuovamente. La MS è stata condotta mediante lo spettrometro Voyager super STR (Applied Biosystems, Foster City, CA) corredato di un laser nitrogene di 337 nm. L'analisi è stata eseguita in reflectrone con un acceleratore di voltaggio di 20 kV, un parametro di ritardo di estrazione di 350 ns, e un limite basso di massa di 850 Da. Gli spettri sono stati ottenuti dalla somma di 150-300 spari laser consecutivi. I picchi di massa sono stati estratti dagli spettri e l'identificazione proteica è stata effettuata utilizzando il MASCOT 2.1 peptide mass

fingerprint tool e il motore di ricerca ProFound del PROWL (<http://prwl.rockefeller.edu>). Come databases sono stati utilizzati il SWISS_PROT e il TrEMBL utilizzando come limiti per la ricerca i seguenti: specie umana, tolleranza della massa ± 50 ppm, clivaggio perso con la tripsina fino a 1 e modificazioni della cisterna per carbamidometilazione.

III f. Analisi Statistica

I valori di densità ottica delle proteine di interesse sono stati espressi come % di volume. L'analisi statistica di comparazione tra i livelli di espressione delle singole proteine nella saliva dei pazienti arruolati è stata effettuata mediante test ANOVA per il confronto delle medie tra più gruppi analizzati simultaneamente e mediante *t*-test per il confronto delle medie dei gruppi a due a due. Un p-value <0.05 è stato considerato statisticamente significativo.

IV. RISULTATI

IVa. ANALISI DEI GEL SINTETICI

Le figure allegate rappresentano rispettivamente le immagini dei gel sintetici e dei gel rappresentativi ottenuti dalla saliva dei soggetti sani e dei pazienti con SjS, Sclerodermia, sindrome secca, e profilo autoanticorpale patologico: anti-SSA e anti-SSA + anti-SSB positivi. (Fig 6-17 vedi allegati)

Il confronto della percentuale di volume degli spot presenti nei gel sintetici dei gruppi in esame, considerati a due a due, ha evidenziato differenze statisticamente significative nell'espressione qualitativa e quantitativa di numerose proteine salivari.

In particolare, comparando il gel sintetico ottenuto dal gruppo di pazienti affetti da SjS con quello dei controlli, è stato possibile identificare 10 spots presenti solo nel gel sintetico patologico e 4 spots presenti solo in quello dei controlli. Nell'ambito dei 10 spots è stata evidenziata la presenza di diverse proteine con pI tra 5,0 e 6,5 e PM intorno a 30-45 Kda, come il precursore della Zn- α_2 -glicoproteina (spot n° 33)*, anche se l'analisi di massa non è stata in grado di identificare la totalità degli spots (spots n°48, 46, 30, 34). E' inoltre stato possibile documentare la presenza di numerose proteine coinvolte nei processi flogistici come: la calgranulina B, la lipocalina e la fosfatidiletanolamina binding protein, nonché, spots (n°47) relativi all'espressione della catena leggera κ delle immunoglobuline. Nell'ambito degli spots presenti solo nel gel sintetico dei controlli è invece da sottolineare quello (spot n° 29) relativo alla carbonato anidrasi VI e alle cistatine e ai loro precursori (cistatina D, C, S) (spots n° 5,7,12). La tabella 9 riassume le principali differenze qualitative che lo studio ha permesso di evidenziare. La tabella 10 mostra, invece, le differenze quantitative relative alle proteine la cui espressione differisce di almeno due volte nei due gruppi. L'analisi dei gel, infatti, ha mostrato 14 spots caratterizzati da una diversa intensità tra pazienti e controlli: 10 spots mostravano un costante incremento (spots n°10, 35, 36, 32, 17, 2, 4, 18, 19, 21) nei malati rispetto ai controlli mentre 4 risultavano significativamente meno intensi (spots n°40, 9, 23, 16) nei pazienti con SjS (102,103).

**I numeri degli spots si riferiscono ai gel rappresentativi*

Tabella 9. Proteine presenti esclusivamente nel gel sintetico dei pazienti con Sjs o nei soggetti sani

| Spot No | Protein | Swiss-Prot accession no | Mr (x10 ³) | pI | sequence coverage% | Matched peptides |
|-----------------------|--|-------------------------|------------------------|------|--------------------|------------------|
| Controlli sani | | | | | | |
| 5 | Cystatin D | P28325 | 16.1 | 7.63 | 31 | 5 |
| 7 | Cystatin C precursor | P01034 | 16 | 9.00 | 49 | 14 |
| 12 | Cystatin S precursor | P01036 | 16.4 | 4.95 | 68 | 12 |
| 29 | Carbonic anhydrase VI | Q5FC00 | 35.4 | 8.43 | 24 | 9 |
| Sjs | | | | | | |
| 41 | Calgranulin B | P06702 | 13.2 | 5.71 | 76 | 9 |
| 42 | Cyclophilin A | P62937 | 18 | 7.82 | 85 | 17 |
| 43 | Lipocalin-1 precursor | P31025 | 19.4 | 5.39 | 31 | 4 |
| 45 | Phosphatidyl ethanolamine binding protein (PEBP) | P30086 | 21 | 7.42 | 92 | 20 |
| 47 | IGKC protein | Q6GMW1 | 26 | 7.55 | 41 | 8 |
| 33 | Zinc- α_2 -glycoprotein precursor | P25311 | 34 | 5.57 | 23 | 11 |

Tabella 10. *Proteine espresso con diversa concentrazione nei gel sintetici dei SjS e dei controlli sani*

| Spot No | Protein name | Swiss-Prot accession no. | Mr(x10 ³) | | pI | | sequence coverage % | Matched peptides | Score |
|---------|--|--------------------------|-----------------------|--------|-------|--------|---------------------|------------------|-------|
| | | | Theor | Observ | Theor | Observ | | | |
| 10 | fatty acid-binding protein(E-FABP) | Q01469 | 15.3 | 12.0 | 6.84 | 6.48 | 68 | 17 | 108 |
| 35 | ACTB protein (actin) | Q96E67 | 40.5 | 40.1 | 5.55 | 5.24 | 57 | 21 | 114 |
| 36 | β-actin fragment | Q96HG5 | 41.3 | 41.0 | 5.56 | 5.04 | 23 | 8 | 50 |
| 32 | leukocyte elastase inhibitor | P30740 | 42.8 | 40.7 | 5.90 | 6.08 | 23 | 8 | 43 |
| 17 | glutathione-S-transferase | P09211 | 23.4 | 23.4 | 5.44 | 5.56 | 32 | 6 | 48 |
| 40 | α-amylase precursor | P04745 | 58.4 | 54.9 | 6.47 | 6.40 | 62 | 31 | 177 |
| 9 | cystatin SN precursor | P01037 | 16.5 | 12.0 | 6.82 | 7.52 | 69 | 10 | 105 |
| 23 | keratin 6-L | Q5XKE5 | 58 | 33.1 | 6.75 | 4.52 | 14 | 7 | 37 |
| 16 | prolactin-inducible protein precursor(PIP) | P12273 | 16.8 | 14.8 | 8.26 | 4.64 | 69 | 10 | 105 |
| 18 | not identified | -- | nd | 23.4 | nd | 5.20 | -- | -- | -- |
| 19 | not identified | -- | nd | 23.9 | nd | 5.00 | -- | -- | -- |
| 21 | not identified | -- | nd | 24.5 | nd | 7.32 | -- | -- | -- |
| 4 | not identified | -- | nd | 11.8 | nd | 5.60 | -- | -- | -- |
| 2 | not identified | -- | nd | 42.8 | nd | 6.36 | -- | -- | -- |

Il confronto tra il gel sintetico dei pazienti con Sclerodermia e dei controlli sani ha, invece, messo in luce 20 spots che sono risultati presenti solo nelle immagini bidimensionali dei soggetti con Sclerodermia ed assenti nei controlli. Con la spettrometria di massa è stato possibile identificare 13 di tali 20 spots che sono risultati confluire in 9 proteine identificate come: ciclofillina A (spot n°42), calgranulina B (spots n°41, 52, 53, 54), psoriasina (spot n°55), beta-2-microglobulina (spot n°56), calgranulina A (spot n°57, 58), gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (spot n°64), TPI (spot n°65), complesso Arp2/3 (spot n°67) e cistatina B (spot n°59). La tabella 11 riassume questi risultati.

Nel confronto tra gel sintetico dei pazienti con Sclerodermia e SjS gli spots relativi a psoriasina (spot n°55), calgranulina A (spot n°57, 58), gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (spot n°64), TPI (spot n°65), complesso Arp2/3 (spot n°67) e cistatina B (spot n°59) e carbonato anidrasi VI (spot n°26-29) risultavano presenti solo nel gel sintetico dei pazienti con sclerodermia. Non risultavano, invece, identificabili nel gel sintetico dei pazienti con Sclerodermia gli spot relativi alla E-FABP e alla lipocalina . Ulteriori differenze tra gel sintetici dei pazienti con SjS e Sclerodermia emergevano nell'espressione delle cistatine e dei loro precursori, dell' α -amilasi salivare, della cheratina 6L, della PIP, della glutatione-S-transferasi e dell'inibitore dell'elastasi leucocitaria.

Tabella 11. Spot proteici identificati solo nel gel sintetico dei pazienti con Scleroderma e non nei controlli

| Spot No | Protein | Swiss-Prot accession no | Mr (x10 ³) | pI | sequence coverage% | Matched peptides |
|---------|---|-------------------------|------------------------|------|--------------------|------------------|
| 41 | Calgranulin B | P06702 | 13.2 | 5.71 | 76 | 9 |
| 52 | Calgranulin B | P06702 | 13.2 | 5.71 | 53 | 5 |
| 54 | Calgranulin B | P06702 | 13.2 | 5.71 | 70 | 7 |
| 53 | Calgranulin B** | P06702 | 13.2 | 5.71 | 55 | 7 |
| 55 | Psoriasis | P31151 | 11.4 | 6.26 | 49 | 7 |
| 56 | β2-microglobulin | Q6IAT8 | 13.8 | 6.06 | 37 | 4 |
| 57 | Calgranulin A | P05109 | 10.8 | 6.51 | 62 | 8 |
| 58 | Calgranulin A | P05109 | 10.8 | 6.51 | 63 | 11 |
| 59 | Cystatin B | P04080 | 11.1 | 6.96 | 64 | 6 |
| 42 | Cyclophilin A | P62937 | 18 | 7.82 | 54 | 11 |
| 64 | Glyceraldeyde-3-**-phosphate dehydrogenase | P04406 | 35.9 | 8.58 | 23 | 5 |
| 65 | Triose phosphate isomerase | P60174 | 26.8 | 6.51 | 62 | 15 |
| 67 | Actin-related protein 2/3 complex subunit 2 | O15144 | 34.4 | 6.84 | 43 | 18 |

I risultati del confronto dei rimanenti gel sintetici sono riassunti nella Tabella 12

Tabella 12: Gel sintetici a confronto

| | | | | | | |
|------------|----------------------------------|---------|------|-----------------------|-----|-------------------|
| vs | Sindrome secca idiopatica | | | | | |
| SjS | lipocalina | amilasi | PEPB | Carbonato anidrasi VI | PIP | Cistatina B, D, S |

| | | | | | | |
|------------|--------------------|---------|-----------------------|-----|-------------------|--|
| vs | Anti-Ro/SSA | | | | | |
| SjS | lipocalina | amilasi | Carbonato anidrasi VI | PIP | Cistatina B, D, S | |

| | | | | | | |
|------------|----------------------------------|---------------------------------|--|--|-----|-------------|
| vs | Sindrome secca idiopatica | | | | | |
| SjS | lipocalina | Inibitore elastasi leucocitaria | | | PIP | Cistatina D |

| | | | | | | |
|---------------------|----------------------------------|-------------|----------------|--------------|-----|----------------|
| vs | Sindrome secca idiopatica | | | | | |
| Sclerodermia | Cistatina B | Cistatina S | Calgranulina B | Cistatina SN | PIP | Ciclofillina A |

| | | | | | | |
|---------------------|--------------------|-------------|----------------|--------------|--------|---------------------------|
| vs | Anti-Ro/SSA | | | | | |
| Sclerodermia | Cistatina B | Cistatina D | Calgranulina B | Cistatina SN | actina | β -2 microglobulina |

| | | | | | | |
|---------------------|----------------------------------|--|---------|--------------|--|--|
| vs | Anti-Ro/SSA + Anti-La/SSB | | | | | |
| Sclerodermia | Cistatina B | | amilasi | Cistatina SN | | |

| | | | | | | |
|--------------------|----------------------------------|--|----------------------|--|----------------------|--|
| vs | Anti-Ro/SSA + Anti-La/SSB | | | | | |
| Anti-Ro/SSA | β -2 microglobulina | | Spot n° 68 (non id.) | | Spot n° 80 (non id.) | |

| | | | | | | |
|--------------------|----------------------------------|--|-------------|----------------|-----|--|
| vs | Sindrome secca idiopatica | | | | | |
| Anti-Ro/SSA | Calgranulina B | | Cistatina S | Calgranulina A | PIP | |

| | | | | | | |
|----------------------------------|----------------------------------|----------------------|----------------|---------------------|--|--|
| vs | Sindrome secca idiopatica | | | | | |
| Anti-Ro/SSA + Anti-La/SSB | amilasi | Spot n° 91 (non id.) | Calgranulina B | Spot n° 5 (non id.) | | |

L'analisi dei gel sintetici data l'alta stringenza dei gel stessi (100%) non permette di valutare in maniera effettiva variazioni qualitative o quantitative nell'espressione delle proteine dal momento

che sono automaticamente esclusi dal sintetico gli spot non condivisi da tutti i singoli gel di ciascun gruppo. Tuttavia essa ha consentito di restringere il campo d'analisi a 15 proteine la cui espressione sembra variare in maniera significativa nei gruppi.

IVb. ANALISI QUANTITATIVA DELLE PROTEINE DI INTERESSE

I dati preliminari hanno consentito di identificare 15 proteine espresse in maniera diversa nei gruppi in esame. Tali proteine sono elencate in Tabella 13 insieme all'analisi quantitativa della percentuale di volume ad esse relativa che è stata condotta misurando le singole percentuali di volume di ciascuno spot di interesse su ciascuno dei gel analitici di ogni gruppo e calcolandone media e deviazione standard.

Tabella 13. Media e deviazione standard della densità ottica delle proteine

| | Controllo sano | | SjS | | Sindrome secca | | Sclerodermia | | SSA | | SSA/SSB | |
|--------------------------|----------------|----------|----------|----------|----------------|----------|--------------|----------|---------|----------|---------|----------|
| | media | DS | media | DS | media | DS | media | DS | media | DS | media | DS |
| amilasi | 2.758571 | 1.049070 | 0.793333 | 0.434885 | 1.412000 | 0.598000 | 3.618000 | 3.120203 | 3.1067 | 2.301127 | 0.9500 | 0.532000 |
| PIP | 9.027143 | 3.641473 | 3.050000 | 2.033273 | 2.060000 | 2.738786 | 5.354000 | 1.742708 | 4.8433 | 1.836264 | 3.5680 | 3.801200 |
| albumina | 2.654286 | 0.627876 | 2.293000 | 2.016339 | 1.727500 | 0.991543 | 3.294000 | 1.229789 | 2.9140 | 1.200637 | 1.4260 | 0.800768 |
| cheratina 6L | 1.844000 | 0.510911 | 0.290000 | 0.485489 | 0.101000 | 0.174937 | 4.910000 | 1.307918 | 2.0325 | 1.607407 | 1.4125 | 1.984698 |
| actina | 0.661000 | 0.250000 | 1.340000 | 0.340000 | 1.236667 | 0.615911 | 0.690909 | 0.309207 | 0.99200 | 0.392173 | 0.9500 | 0.532466 |
| carbonato VI | 3.395714 | 1.375753 | 0.414000 | 0.625392 | 0.690000 | 0.283196 | 0.816000 | 0.578299 | 2.6025 | 2.244777 | 0.2260 | 0.311897 |
| cistatina SN | 4.764615 | 1.882947 | 1.419615 | 0.735749 | 0.967500 | 0.781340 | 6.127833 | 4.283895 | 2.3467 | 0.615169 | 3.4975 | 3.242452 |
| cistatina S | 2.086000 | 0.480240 | 0.735714 | 0.548266 | 0.462250 | 0.221447 | 1.501667 | 0.471950 | 1.2000 | 0.420535 | 0.3375 | 0.430842 |
| cistatina D | 0.734000 | 0.698000 | 0.527273 | 0.621741 | 0.517500 | 0.531311 | 1.640000 | 0.669925 | 0.7520 | 0.353935 | 1.1575 | 0.526712 |
| Imb. Elastasi leuc | 0.170000 | 0.020000 | 0.540000 | 0.110000 | 0.280000 | 0.226936 | 0.218333 | 0.094110 | 0.2470 | 0.40106 | 0.2840 | 0.240217 |
| lipocalina | 0.020000 | 0.056569 | 0.165000 | 0.110454 | 0.031667 | 0.077567 | nd | | nd | | nd | |
| ciclofillina A | nd | | 0.358000 | 0.110454 | 0.260000 | 0.109087 | 0.262857 | 0.089762 | 0.2467 | 0.064291 | 0.1800 | 0.17356 |
| calgranulina B | 0.091667 | 0.142887 | 2.442000 | 1.353706 | 1.890000 | 0.470957 | 3.302857 | 1.353067 | 1.7317 | 0.853379 | 2.6525 | 1.654476 |
| β 2 microglobulina | 0.580000 | 0.370135 | 1.793000 | 0.624000 | 0.887000 | 0.299070 | 1.112500 | 0.615090 | 0.5133 | 0.166693 | 1.08800 | 0.574000 |
| IgKc | 0.272000 | 0.177398 | 0.760000 | 0.214243 | 0.570000 | 0.203000 | 0.243333 | 0.230275 | 0.3645 | 0.194491 | 0.4400 | 0.229637 |

Il confronto delle medie della densità ottica nei gruppi è stato effettuato mediante test ANOVA e i risultati ottenuti sono riassunti in tabella 14.

Tabella 14. Test ANOVA per il confronto delle medie della densità ottica tra i gruppi

| | ANOVA su tutti i gruppi | Espressione nello SjS |
|---------------------------------|----------------------------|-----------------------|
| albumina | p=0,28 | invariata |
| amilasi | p=0,013 | ridotta |
| PIP | p=0,001 | ridotta |
| cheratina 6L | p=0,004 | ridotta |
| carbonato VI | p<0,0001 | ridotta |
| actina | p=0,001 | aumentata |
| cistatina SN | p<0,0001 | ridotta |
| cistatina S | p<0,0001 | ridotta |
| cistatina D | p=0,018 | ridotta |
| Inibitore elastasi leucocitaria | p<0,0001 | aumentato |
| lipocalina | p=0,003 | aumentata |
| ciclofillina A | p=? | aumentata |
| calgranulina B | p=0,001 | aumentata |
| β -2 microglobulina | p=0,0007 | aumentata |
| IgKc | p=0,0013 | aumentata |

Per chiarire il significato delle differenze osservate con il test ANOVA il confronto delle medie della densità ottica dei diversi spot rispetto alla SjS è stato effettuato mediante t-test di Student ed i risultati ottenuti sono riassunti in tabella 15.

Tabella 15. Risultati t-test confronto SjS verso controlli sani e patologici

| p- value (SjS vs..) | sano | sicca | sclero | SSA | SSA/SSB |
|---------------------------|-------------------|--------------|-------------------|---------------|-------------|
| albumina | 0,65 | 0,60 | 0,33 | 0,54 | 0,37 |
| amilasi | 0,0002 | 0,06 | 0,01 | 0,01 | 0,82 |
| PIP | 0,0009 | 0,45 | 0,05 | 0,10 | 0,74 |
| cheratina 6L | 0,0011 | 0,40 | <0,0001 | 0,06 | 0,25 |
| carbonato VI | <0,0001 | 0,42 | 0,25 | 0,01 | 0,54 |
| actina | <0,0001 | 0,69 | 0,0027 | 0,01 | 0,01 |
| cistatina SN | <0,0001 | 0,30 | 0,001 | 0,06 | 0,03 |
| cistatina S | 0,0013 | 0,37 | 0,02 | 0,14 | 0,24 |
| cistatina D | 0,51 | 0,97 | 0,003 | 0,46 | 0,09 |
| Inib. Elastasi leuc | 0,0001 | 0,007 | 0,0001 | 0,03 | 0,01 |
| lipocalina | 0,0056 | 0,02 | nd | nd | nd |
| ciclofillina A | nd | 0,20 | 0,137 | 0,18 | 0,07 |
| calgranulina B | 0,002 | 0,46 | 0,30 | 0,31 | 0,83 |
| β -2 microglobulina | 0,0025 | 0,023 | 0,045 | 0,0004 | 0,06 |
| IgKc | 0,0019 | 0,15 | 0,0015 | 0,005 | 0,04 |

La tabella 16 illustra, infine, i risultati del confronto tra i vari gruppi e i controlli sani.

Tabella 16. Risultati di confronto dei gruppi patologici verso il gruppo di controllo dei soggetti sani ricavati con il t-test di Student

| p- value (sano vs..) | SjS | sicca | sclero | SSA | SSA/SSB |
|---------------------------|-------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| albumina | 0,65 | 0,08 | 0,26 | 0,63 | 0,06 |
| amilasi | 0,0002 | 0,03 | 0,50 | 0,72 | 0,05 |
| PIP | 0,0009 | 0,0049 | 0,06 | 0,03 | 0,01 |
| cheratina 6L | 0,0011 | 0,0014 | 0,001 | 0,33 | 0,42 |
| carbonato VI | <0,0001 | 0,0042 | 0,003 | 0,47 | 0,0005 |
| actina | <0,0001 | 0,023 | 0,8 | 0,06 | 0,18 |
| cistatina SN | <0,0001 | 0,0015 | 0,34 | 0,06 | 0,33 |
| cistatina S | 0,0013 | 0,0004 | 0,07 | 0,01 | 0,0008 |
| cistatina D | 0,51 | 0,59 | 0,03 | 0,95 | 0,31 |
| Inib. Elastasi leuc | 0,0001 | 0,11 | 0,11 | 0,11 | 0,12 |
| lipocalina | 0,0056 | 0,7 | nd | nd | nd |
| calgranulina B | 0,002 | 0,0001 | 0,0001 | 0,0009 | 0,005 |
| β -2 microglobulina | 0,002 | 0,22 | 0,11 | 0,69 | 0,13 |
| IgKc | 0,0019 | 0,03 | 0,82 | 0,43 | 0,25 |

V. DISCUSSIONE

I risultati ottenuti hanno permesso di mettere in evidenza numerose differenze tra il pattern proteico salivare dei pazienti con SjS ed i profili proteici salivari dei soggetti sani e dei controlli patologici.

In particolare nello studio sono state valutate le differenze relative all'espressione delle seguenti proteine salivari:

- proteine salivari acinari (albumina, α -amilasi salivare, PIP, cheratina 6L, anidrase carbonica VI).
- proteine infiammatorie e legate all'autoimmunità (calgranulina B, ciclofillina A, catena leggera κ delle immunoglobuline, beta2-microglobulina)
- proteine coinvolte nell'equilibrio proteasi / antiproteasi (cistatine D, S, SN e loro precursori, inibitore dell'elastasi leucocitaria)
- proteine coinvolte nel danno tissutale (actina, lipocalina-1 precursore)

Il profilo di espressione delle proteine salivari prodotte a livello acinare appare modificato nei pazienti con SjS rispetto ai controlli sani con una riduzione dell'intensità ottica dello spot principale dell'albumina e degli spot dell' α -amilasi salivare, della PIP, della cheratina 6L e della carbonato anidrase VI. E' possibile osservare una riduzione dell'espressione delle suddette proteine acinari (seppure ai limiti della significatività statistica) anche nei profili proteici salivari dei controlli patologici, secondo un gradiente che avvicina i pazienti con SjS a quelli con sindrome sicca idiopatica e ai soggetti asintomatici con anticorpi anti-RoSSA/+ anti-La/SSB e, viceversa, i controlli sani ai soggetti affetti da sclerodermia e ai portatori asintomatici di anti-Ro/SSA. I dati ottenuti sono in linea con gli studi della letteratura che documentano nella saliva dei pazienti con SjS una riduzione dell' α -amilasi salivare e della carbonato deidrogenasi VI (81). Le ipotesi proposte per giustificare la ridotta espressione delle proteine suddette sono fondamentalmente quelle della frammentazione proteica aumentata e quella di una ridotta produzione da danno acinare. La prima ipotesi può giustificare in maniera relativamente lineare la riduzione dello spot principale dell'albumina nei pazienti con SjS: quando esso viene sommato ai frammenti di albumina identificati alla spettrometria di massa, la densità degli spot totali dell'albumina non risulta statisticamente differente nel confronto tra i pazienti con SjS e tutti gli altri gruppi in studio. Anche la riduzione della PIP potrebbe essere correlata sia ad una ridotta

produzione che allo stato di infiammazione subclinica cronica del cavo orale dal momento che nel confronto con i controlli sani essa si riduce in particolare nei soggetti con SjS e con sindrome secca. La PIP è, infatti, una proteina di secrezione presente nella saliva in forma glicosilata e non glicosilata la cui funzione seppure in larga parte ancora da chiarire, sembra essere quella di legarsi ad altre proteine come il fibrinogeno, l'actina, la cheratina, la miosina e la tropomiosina. La PIP si lega anche all'idrossiapatite, componente principale della pellicola dei denti e sembra capace di legarsi ai batteri del cavo orale svolgendo un ruolo potenziale nell'immunità innata e nella difesa delle mucose (104). La riduzione della PIP che è stata evidenziata potrebbe, pertanto, essere analoga a quella della PIP lacrimale descritta nei pazienti con blefarite cronica. Altre due proteine ricche in prolina, che si riducono nei controlli patologici sono l' α -amilasi salivare e la carbonato deidrogenasi VI, la prima è un'idrolasi coinvolta nella digestione buccale dell'amido, la seconda nell'idratazione reversibile del diossido di carbonio e, di conseguenza, nel mantenimento dell'omeostasi del pH salivare. La riduzione della carbonato deidrogenasi è probabilmente la più eclatante al punto che gli spots (es.n° 26-29) che l'identificano sono addirittura mancanti nel gel sintetico dei soggetti con SjS. Il risultato può giustificare anche la tendenza del pH salivare dei pazienti con SjS ad essere complessivamente più basso (pH 6.75 ± 0.41) che nei controlli sani (pH 7.00 ± 0.48). Nel dettaglio nei gel dei soggetti sani è stato possibile identificare tre diversi spots per la carbonato deidrogenasi VI, probabilmente correlabili a isoforme dell'enzima, mentre nei singoli gel dei pazienti con SjS è stato possibile documentarne o una marcata riduzione o addirittura la non espressione. Questo dato è in linea con quanto recentemente pubblicato in letteratura in cui è stata documentata una riduzione dell'espressione del gene della carbonato deidratasi VI nelle ghiandole salivari minori dei pazienti con SjS (105). Una riduzione della carbonato deidrogenasi VI è in realtà evidenziabile anche nei soggetti con sindrome secca, con sclerodermia e nei portatori asintomatici di anti-Ro/SSA+ anti-La/SSB, mentre i valori di densità dei portatori degli anti-Ro/SSA sono sovrapponibili ai controlli sani.

Infine, sempre nell'ambito dell'espressione delle proteine acinari, lo studio ha permesso di documentare una riduzione nell'espressione della cheratina 6L nei soggetti con SjS e sindrome secca ed uno spiccato aumento della stessa nei pazienti con Sclerodermia ($p < 0,0001$), verosimilmente in relazione al processo fibrotico che caratterizza la malattia.

Complessivamente, con l'eccezione della cheratina, relativamente all'espressione delle proteine acinari si conferma quindi lo spettro di riduzione che ha ai due estremi i gel dei pazienti con SjS e i controlli sani. I soggetti con sindrome secca idiopatica e quelli con

anticorpi anti-Ro/SSA+ anti-La/SSB sono più simili ai pazienti con SjS, i pazienti con sclerodermia e quelli con anti-Ro/SSA ai controlli sani.

Accanto alle modificazioni nei livelli di espressione delle proteine salivari tipiche, il pattern proteico salivare dei pazienti con SjS presenta una combinazione di proteine pro-infiammatorie e legate al sistema immunitario. In realtà, proteine infiammatorie come la calgranulina B e la ciclofillina A, sono espresse in maniera aumentata, e non significativamente diversa che nello SjS, anche nei profili salivari dei pazienti con sindrome secca, sclerodermia e autoanticorpi anti-Ro/SSA e anti-Ro/SSA + anti La/SSB. assumendo quindi un significato aspecifico. La ciclofillina A è il prototipo di una famiglia di proteine altamente conservate, coinvolte in molti processi biologici come l'espressione, l'assemblamento e la degradazione delle proteine. Nell'ambito dei processi di flogosi la ciclofillina A sembra agire con meccanismo autocrino e paracrino, come attivatore delle cellule endoteliali contribuendo all'attivazione immuno-mediata e alla disfunzione endoteliale. La calgranulina B, invece, appartiene alla famiglia S100 delle proteine leganti il calcio ed è noto che viene espressa sia nei processi di flogosi acuta che nei processi di flogosi cronica. A differenza della calgranulina B e della ciclofillina A, i pazienti con SjS presentano un aumento statisticamente significativo, rispetto agli altri gruppi di pazienti, della beta-2 microglobulina e dell'espressione della catena leggera κ delle immunoglobuline. Questo risultato, può riflettere l'attivazione policlonale, sistemica e salivare, dei linfociti B nella sindrome di SjS e conferma, anche in questo caso, precedenti osservazioni della letteratura (40, 81).

Un ulteriore elemento peculiare del pattern salivare dei pazienti con SjS presente solo nei soggetti con sindrome secca idiopatica e non nei controlli sani nè nei pazienti con sclerodermia anti-Ro/SSA e anti-Ro/SSA + anti-La/SSB, concerne l'alterazione del bilancio tra proteasi e anti-proteasi salivari. Il dato più rilevante è a carico delle cistatine, S e SN. Le cistatine sono proteine inibitrici delle cistein-proteinasi che svolgono il ruolo di proteggere i tessuti da un'attivazione di sregolata delle proteinasi stesse. Le cistatine sono espresse in una ampia varietà di isoforme che possono differenziarsi per il grado di fosforilazione e/o glicosilazione. Nello studio la loro marcata riduzione può riflettere un consumo da parte delle proteasi considerando la variazione consensuale nella SjS e nelle sindromi sicche idiopatiche della cistatina SN e della S. La cistatina D non sembra presentare modificazioni significative nei pazienti con SJS rispetto ai controlli sani e agli altri gruppi patologici, con l'eccezione della Sclerodermia nella quale i livelli di cistatina D sembrano essere aumentati. Nell'ambito delle alterazioni presentate dal sistema degli

inibitori delle proteasi si osserva, inoltre, in modo peculiare nei pazienti con SjS, un aumento nei livelli di espressione di altre proteine inibitrici di proteasi salivari come la proteina inibitrice dell'elastasi leucocitaria. Questa proteina appartiene alla famiglia delle proteine inibitrici delle serin-proteasi e regola in primis l'attività delle proteasi dei neutrofili /elastasi, catepsina G e proteinasi 3. Il significato ultimo dello squilibrio osservato e la preponderante espressione delle proteine inibitrici le serin-proteasi sulle cistein-proteasi rimane in larga parte da chiarire.

Infine, in generale, nella saliva dei pazienti con SjS si osserva un'ampia espressione di proteine coinvolte nel danno tissutale sia come effettori del danno che come fattori di protezione nei confronti del danno tissutale stesso. Tra esse è stato possibile osservare, nello studio, l'aumento dell'actina e della lipocalina-1. L'actina aumenta in maniera statisticamente significativa nei pazienti con SjS e con sindrome sicca idiopatica mentre la lipocalina-1 solo nei pazienti con SjS. L'actina è una proteina del citoscheletro contenuta in tutti gli elementi cellulari. Un aumento della concentrazione salivare dell'actina è descritto anche nei pazienti con mucositi correlate a radioterapia per neoplasie del cavo orale ed è quindi considerato come marker aspecifico di danno del cavo orale. La lipocalina-1 è, invece, una proteina che agisce come scavenger fisiologico delle molecole che derivano dalla per ossidazione lipidica ma anche come inibitore delle serin-proteasi. Il suo aumento significativo nella saliva dei pazienti con SjS rimane ancora da chiarire ed appare particolarmente interessante considerando che recentemente la lipocalina-1 è stata identificata come potenziale autoantigene nelle lacrime dei pazienti affetti da SjS (106).

VI. CONCLUSIONI

Questo studio ha permesso di caratterizzare mediante analisi proteomica il profilo proteico della saliva dei pazienti con SjS confrontando il pattern ottenuto non solo con quello dei controlli sani ma anche rispetto ai diversi pattern di un gruppo eterogeneo di controlli patologici: pazienti con flogosi cronica del cavo orale ad eziologia non immune, pazienti con malattia autoimmune sistemica e pazienti con profilo autoanticorpale patologico analogo a quello dei pazienti con sindrome di Sjogren ma asintomatici per quanto relativo alla secchezza orale e oculare. I risultati ottenuti, seppure preliminari, hanno mostrato come il profilo proteico salivare dei pazienti con SjS risulti estremamente complesso e presenti aspetti peculiari che in parte riflettono l'impegno flogistico selettivo da parte della malattia delle ghiandole salivari, in parte riflettono le alterazioni del microambiente orale che essa induce e in parte, infine, la natura autoimmune sistemica della SjS. L'analisi a confronto delle modificazioni subite dal pattern proteico salivare normale, nella SjS e nelle altre diverse situazioni patologiche, ha permesso di focalizzare l'attenzione, in particolare, su 15 proteine (albumina, amilasi, proteina inducibile la prolattina, cheratina 6 L, carbonato deidrogenasi VI, cistatina SN, S, D, inibitore dell'elastasi leucocitaria, actina, lipocalina, ciclofillana A, calgranulina B, beta-2-microglobulina e catena leggera kappa delle Ig) e di speculare sull'eziopatogenesi delle modificazioni osservate.

Complessivamente nella SjS si osserva una marcata riduzione delle proteine a secrezione acinare (albumina, amilasi, proteina inducibile la prolattina, cheratina 6 L, carbonato deidrogenasi VI), una riduzione delle cistatine ed un incremento delle proteine inibitrici delle serin proteasi, un aumento delle proteine infiammatorie e delle proteine legate al danno tissutale (actina) ma soprattutto, in maniera specifica, un incremento nell'espressione della beta-2-microglobulina e della catena leggera kappa delle immunoglobuline, riconducibili all'attivazione B cellulare a livello ghiandolare ed un incremento della lipocalina, proteina scavenger, sospettata di svolgere ruolo di autoantigene a livello lacrimale. L'insieme delle alterazioni osservate suggerisce che il dosaggio dei livelli salivari di un numero limitato di proteine, identificate tramite analisi proteomica, possa costituire un valido ausilio nella diagnosi di malattia, configurando una sorta di algoritmo proteico da applicare soprattutto nei casi che rimangono dubbi nelle indagini di diagnostica tradizionale. In conclusione, quindi, seppure a livello preliminare, lo studio ha mostrato come l'analisi proteomica di fluidi biologici, scarsamente complessi

e facilmente reperibili come la saliva, possa rappresentare un'arma utile ed efficace nella diagnosi delle malattie reumatiche, in generale, e della SjS in particolare.

VII. BIBLIOGRAFIA

1. Ramos-Casals M., Tzioufas AG., Font J. Primary Sjogren's syndrome: new clinical and therapeutic concepts. *Ann Rheum Dis* 2005; 64: 347-354
2. Fox RJ. Sjogren's Syndrome. *Lancet* 2005; 366:321-331
3. Thomas E., Hay EM., Hajeer A., Silman AJ. Sjogren's syndrome: a community-based study of prevalence and impact. *Br J Rheumatol* 1998; 37: 1069-1076
4. Pillemer SR., Matteson EL., Jacobsson LT. Incidence of Physician-diagnosed primary Sjogren's syndrome in residents of Olmsted County, Minnesota. *Mayo Clin Proc* 2001; 76; 593-99
5. Bowman SJ., Ibrahim GH., Holmes G., Hamburger J., Ainsworth JR. Estimating the prevalence among Caucasian women of primary Sjogren's syndrome in two general practises in Birmingham, UK. *Scand J Rheumatol* 2004; 33:39-43
6. Trontzas PI., Andrianakos AA. Sjogren's syndrome: a population based study of prevalence in Greece. The ESORDIG study. *Ann Rheum Dis* 2005; 64: 1240-1241
7. Vitali C., Bombardieri S., Jonsson R., Moutsopoulos HM., Alexander EL, Carson SE., et al. Classification Criteria for Sjogren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. *Ann Rheum Dis* 2002; 61:554-8
8. Theander E., Manthorpe R., Jacobsson THL. Mortality and causes of death in primary Sjogren's syndrome. A Prospective cohort study. *Arthritis Rheum* 2004; 50:1262-1269
9. Arnett F. Histocompatibility typing in the rheumatic diseases: diagnostic and prognostic implications. *Med Clin North Am* 1994; 20: 371-87
10. Delaleu N, Jonsson R., Koller MM. Sjogren's syndrome. *Eur J Oral Sci* 2005; 113:101-113
11. Triantafyllopoulou A., Moutsopoulos HM. Autoimmunity and Coxsackievirus Infection in Primary Sjögren's Syndrome. *Ann N.Y. Acad Sci* 2005; 1050: 389–396
12. Skopouli FN., Moutsopoulos HM. Autoimmune epithelitis : Sjogren's syndrome. *Clin Exp Rheumatol* 1994 ; 12(S11): 9-11
13. Mitsias DI, Tzioufas AG, Veiopoulou C, et al.: The Th1/Th2 cytokine balance changes with the progress of the immunopathological lesion of Sjögren's syndrome. *Clin Exp Immunol* 2002, 128:562–568.
14. Ogawa N., Ping L., Zhenjun L., Takada Y., Sugai S. Involvement of the interferon-gamma-induced T cell-attracting chemokines, interferon-gamma-inducible 10-kd protein

- (CXCL10) and monokine induced by interferon-gamma (CXCL9), in the salivary gland lesions of patients with Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 2002; 46:2730-41
15. Salomonsson S., Larsson P., Tengner P., Mellquist E., Hjelmstrom P., Wahren-Herlenius M. Expression of the B cell-attracting chemokine CXCL13 in the target organ and autoantibody production in ectopic lymphoid tissue in the chronic inflammatory disease Sjogren's syndrome. *Scand J Immunol.* 2002;55:336-42.
16. Youinou P., Daridon C., Saraux A., Devauchelle V., Pers JO. Is B-cell the conductor of the lymphocyte orchestra in the salivary glands of patients with primary Sjögren's syndrome. *Clin Exp Rheumatol* 2006; 24: 491-492.
17. Bolstad AI., Eiken HG., Rosenlund B., et al.: Increased salivary gland tissue expression of Fas, Fas ligand, cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4, and programmed cell death 1 in primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 2003; 48:174–185.
18. Fox RI., Stern M.: Sjögren's syndrome: mechanisms of pathogenesis involve interaction of immune and neurosecretory systems. *Scand J Rheumatol* 2002; 116:3–13.
19. Beroukas D., Hiscock J., Gannon BJ., et al.: Selective down-regulation of aquaporin-1 in salivary glands in primary Sjögren's syndrome. *Lab Invest* 2002; 82:1547–1552.
20. Hansen A., Lipsky PE., Dorner T. New concepts in the pathogenesis of Sjögren syndrome: many questions, fewer answers. *Curr Opin Rheumatol* 2003; 15:563–570
21. Dawson LJ., Stanbury J., Venn N., Hasdimir B., Rogers SN., Smith PM. Antimuscarinic Antibodies in Primary Sjögren's Syndrome Reversibly Inhibit the Mechanism of Fluid Secretion by Human Submandibular Salivary Acinar Cells. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 1165–1173
22. Skopouli FN., Dafni U., Ioannidis JP., Moutsopoulos HM. Clinical evolution, and morbidity and mortality of primary Sjogren's syndrome. *Semin Arthritis Rheum* 2000; 29:296-304
23. Rolando M. Sjogren's syndrome as seen by an ophthalmologist. *Scand J Rheumatol* 2001; S115: 27-33
24. Soto-Rojas AE., Kraus A. The oral side of Sjogren's syndrome. Diagnosis and treatment. A Review. *Arch Med Research* 2002; 33:95-106
25. Hamburger J. Sjogren's syndrome as seen by an oral physician. *Scand J Rheumatol* 2001; S115: 34-39
26. Ramos-Casals M., Font J., Garcia-Carrasco M., Brito MP., Rosas J., Calvo-Alen J et al. Primary Sjogren syndrome: hematologic patterns of disease expression. *Medicine (Baltimore)* 2002; 81: 281-292

27. Tsioufas AG., Boumba DS., Skopouli FN., Moutsopoulos HM. Mixed monoclonal cryoglobulinemia and monoclonal rheumatoid factor cross-reactive idiotypes as predictive factors for the development of lymphoma in primary Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1996; 39: 767-772
28. Voulgarelis M., Dafni UG., Isenberg DA., Moutsopoulos HM. Malignant lymphoma in primary Sjogren's syndrome: a multicenter, retrospective, clinical study by the European Concerted Action on Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1999; 42: 1765-1772
29. Baldini C., Tavoni A., Merlini G., Sebastiani M., Bombardieri S. Sindrome di Sjogren primitiva: descrizione clinica e sierologica di una casistica monocentrica. *Reumatismo*, 2005; 57(4):256-261
30. Praprotnik S., Bozic B., Kveder T., Rozman B. Fluctuation of anti-Ro/SSA antibody levels in patients with systemic lupus erythematosus and Sjogren's syndrome: a prospective study. *Clin Exp Rheumatol* 1999; 17:63-68
31. Loch H, Pelck R., Manthorpe R. Clinical manifestations correlated to the prevalence of autoantibodies in a large cohort of patients with primary Sjogren's syndrome. A comparison of patients initially diagnosed according to the Copenhagen classification criteria with the American-European consensus criteria. *Autoimmun Rev* 2005; 4:276-281
32. Meyer O. Anti-SSA/Ro and anti-SSB/La antibodies. What's new? *Ann Med Interne (Paris)*. 2002;153:520-9
33. Ulbricht KU., Schmidt RE., Witte T. Antibodies against alpha-fodrin in Sjogren's syndrome. *Autoimmun Rev* 2003; 2: 109-113
34. Vitali C, Bombardieri S., Moutsopoulos HM., Balestrieri G., Bencivelli W., Bernstein RM., Bjerrum KB., Braga S., Coll J., de Vita S., et al. Preliminary criteria for the classification of Sjogren's syndrome. Results of a prospective concerted action supported by the European Community. *Arthritis Rheum* 1993; 36:340- 347.
35. Vitali C., Moutsopoulos HM., Bombardieri S. The European Community Study Group on diagnostic criteria for Sjogren's syndrome. Sensitivity and specificity of tests for ocular and oral involvement in Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 1994; 53: 637-647
36. Vivino FB., Gala I. Hermann GA. Change in Final Diagnosis on Second Evaluation of Labial Minor Salivary Gland Biopsies. *J. Rheumatol* 2002; 29: 938-944
37. Greenspan JS, Daniels TE, Talal N, Sylvester RA. The histopathology of Sjogren's syndrome in labial salivary gland biopsies. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1974; 37: 217-229

38. Daniels TE. Labial salivary gland biopsy in Sjogren's syndrome. Assessment as a diagnostic criterion in 362 suspected cases. *Arthritis Rheum* 1984; 27:147-156
39. Pijpe J., Kalk WWI., Bootsma H., Spijkervet FKL., Kallenberg CGM., Vissink A. Progression of salivary gland dysfunction in patients with Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 2007;66: 107-112
40. Stuchell RN., Mandel ID., Baumhart H. Clinical utilization of sialochemistry in Sjogren's syndrome. [J Oral Pathol](#). 1984;13:303-309
41. Cuida M., Halse AK., Johannessen AC., Tynning T., Jonsson R. Indicators of salivary gland inflammation in primary Sjogren's syndrome. *Eur J Oral Sci*. 1997;105:228-33.
42. van der Reijden WA., van der Kwaak JS., Veerman EC., Nieuw Amerongen AV. Analysis of the concentration and output of whole salivary constituents in patients with Sjogren's syndrome. *Eur J Oral Sci*. 1996;104: 335-340
43. Moutsopoulos HM, Karsh J, Wolf RO, Tarpley TM, Tylden A, Papadopoulos NM. Lysozyme determination in parotid saliva from patients with Sjogren's syndrome. *Am J Med* 1980; 69:39-42
44. Jezequel N., Depasse F., Jouquan J., Lelong A., Roncin S., Pare G., Pennec YL., Youinou P. Salivary lactoferrin in primary Sjogren's syndrome. *Clin Exp Rheumatol*. 1989;7:123-5
45. Sreebny L., Zhu WX. Whole saliva and the diagnosis of Sjogren's syndrome: an evaluation of patients who complain of dry mouth and dry eyes. Part 1: Screening tests. *Gerodontology*. 1996;13:35-43
46. Wu AJ, Lafrenie RM, Park C et al. Modulation of MMP-2 (gelatinase A) and MMP-9 (gelatinase B) by interferon-gamma in a human salivary gland cell line. *J Cell Physiol* 1997;171:117-24.
47. Hernandez CC, Donadi EA, Reis ML. Kininogen-kallikrein-kinin system in plasma and saliva of patients with Sjogren's syndrome. *J Rheumatol* 1998;25:2381-4.
48. Kalk WWI., Vissink A., Stegenga B., Bootsma H., Nieuw Amerongen AV., Kallenberg CGM. Sialometry approach for diagnosing Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 2002;61;137-144
49. Choudhary J., Grant SGN. Proteomics in postgenomic neuroscience: the end of the beginning. *Nature Neuroscience* 2004; 5: 440-445.
50. Godovac-Zimmermann J., Soskic V., Poznanovic S., Brianza F. Functional proteomics of signal transduction by membrane receptors. *Electrophoresis* 1999; 20: 952-961.

51. Imam-Sghiouar N., Laude-Lemaire I., Labas V., Pflieger D., Le Caer JP., Caron M., Nabias DK., Joubert-Caron R. Subproteomics analysis of phosphorylated proteins: application to the study of B-lymphoblast from a patient with Scott syndrome. *Proteomics* 2002; 2: 828-838.
52. Graves PR., Haystead ATJ. *Molecular Biologist's Guide to Proteomics Microbiology and Molecular Biol Rev* 2002; 66: 39-63
53. Pandey A., Mann M. Proteomics to study genes and genomes. *Nature* 2000; 405: 837-846.
54. Phizicky E., Bastiaens PI., Zhu H., Snyder M., Fields S. Protein analysis on a proteomic scale. *Nature* 2003; 422: 208-215.
55. Berkelman T., Stenstedt T. 2-D Electrophoresis, using immobilized pH gradients. *Principles and Methods*. Amersham Biosciences 2002; 17-22.
56. Klose J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutation in mammals. *Humangenetik* 1975; 26: 231-243.
57. Gorg A., Postel W., Gunther S., Weser J. Improved horizontal two-dimensional electrophoresis with hybrid isoelectric focusing in immobilized pH gradients in the first dimension and laying-on transfer to the second dimension. *Electrophoresis* 1985; 6: 599-604.
58. Sanchez JC., Rouge V., Pisteur M., Ravier F., Tonella L., Moosmayer M., Wilkins MR., Hochstrasser DF. "Improved and simplified in-gel sample application using reswelling of dry immobilized pH gradients". *Electrophoresis* 1997; 18: 324-327.
59. Candiano G., Bruschi M., Musante L., Santucci L., Ghiggeri GM., Carnemolla B., Orecchia P., Zardi L., Righetti PG. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis* 2004; 25: 1327-1333.
60. Wilkins MR., Williams KL., Appeal RD., Hochstrasser DF. *Proteome research: new frontiers in functional genomics*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg 1997; 1-12.
61. Godovac-Zimmermann J., Brown L. *Perspectives for Functional Proteomics and Mass Spectrometry*. *Mass. Spec. Reviews*, 2001, 20: 1-57
62. Aebersold R., Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 2003; 422: 198-207
63. Fusaro VA., Stone JH. Mass spectrometry-based proteomics and analyses of serum: a primer for the clinical investigator. *Clin Exp Rheumatol*. 2003; 21(S32):S3-14

64. Westermier R., Loland S., Asbury R. La tecnologia proteomica. *Journal of Clinical ligand assay*. 2002. 25: 250-260
65. Bonk T., Humeny A. MALDI-TOF-MS Analysis of Protein and DNA. *The Neuroscientist* 2001; 1: 6-12
66. Langen H., Berndt P., Roder D., Cairns N., Lubec G., Fountoulakis M. Two-dimensional map of human brain proteins". *Electrophoresis* 1999; 20: 907-916.
67. Husi H., Grant SGN. Proteomics of the nervous system. *Trends in Neurosciences* 2001; 5: 259-266
68. Humphrey SP., Williamson RT. A review of saliva: Normal composition, flow, and function. *The journal of prosthetic dentistry* 2001; 85: 162-169.
69. Amado FML., Vitorino RMP., Domingues PMDN., Lobo MJC., Duarte JAR. Analysis of the human saliva proteome. *Expert Rev Proteomics* 2005; 2:521-539
70. Kaufman E., Lamster IB. The diagnostic application of saliva-a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002; 13: 197-212.
71. Drake RR., Cazare LH., Semmes OJ., Wadsworth JT. Serum, salivary and tissue proteomics for discovery of biomarkers for head and neck cancers. *Expert Rev Mol Diagn.* 2005;5:93-100.
72. Huang CM. Comparative proteomic analysis of human whole saliva. *Arch Oral Biol* 2004; 49: 951-962
73. Vitorino R., Lobo M. J., Ferrer-Correira A. J., Dubin, J. R., Tomer K. B., Domingues, P. M., Amado F. M. Identification of human whole saliva protein components using proteomics. *Proteomics* 2004; 4: 1109 -1115
74. Hirtz C., Chevalier F., Centeno D., Egea JC., Rossignol M., Sommerer N., de Périère D. Complexity of the human whole saliva proteome. *J Physiol Biochem* 2005; 61: 469-480
75. Yao Y., Berg EA., Costello CE., Troxler RF, Oppenheim FG Identification of Protein Components in Human Acquired Enamel Pellicle and Whole Saliva Using Novel Proteomics Approaches 2003; 278: 5300-5308
76. Kojima T., Andersen E., Sanchez J. C., Wilkins M. R., Hochstrasser D. F., Pralong W. F., Cimasoni G. Human gingival crevicular fluid contains MRP8 (S100A8) and MRP14 (S100A9), two calcium-binding proteins of the S100 family. *J Dent. Res.* 2000; 79: 740-747.
77. Hardt M, Thomas LR., Dixon SE., Newport G., Agabian N., Prakobphol A., Hall SC., Witkowska HE., Fisher SJ. Toward Defining the Human Parotid Gland Salivary Proteome

and Peptidome Identification and Characterization Using 2D SDS-PAGE, Ultrafiltration, HPLC and Mass Spectrometry. *Biochemistry* 2005; 44: 2885-2899

78. Hu S., Denny P., Xie Y., Loo JA., Wolinsky LE., Li Y., McBride J., Ogorzalek Loo RR., Navazesh M., Wong DT. Differentially expressed protein markers in human submandibular and sublingual secretions. *Int J Oncol* 2004; 25:1423-30.

79. Yang LL., Liu XQ., Liu W., Cheng B., Li MT. Comparative analysis of whole saliva proteomes for the screening of biomarkers for oral lichen planus. *Inflamm Res* 2006; 55:405-7

80. Wong DT. Salivary diagnostics for oral cancer. *J Calif Dent Assoc* 2006;34:303-8

81. Ryu OH., Atkinson JC., Hoehn GT., Illei GG., Hart TC. Identification of parotid salivary biomarkers in Sjogren's syndrome by surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and two-dimensional difference gel electrophoresis. *Rheumatology (Oxford)* 2006;45:1077-86.

82. Hermansson M., Sawaji Y., Bolton M., Alexander S., Wallace A., Begum S., Wait R., Saklatvala J. Proteomic analysis of articular cartilage shows increased type II collagen synthesis in osteoarthritis and expression of inhibin betaA (activin A), a regulatory molecule for chondrocytes. *J Biol Chem* 2004; 279:43514-21

83. De Ceuninck F., Marcheteau E., Berger S., Caliez A., Dumont V., Raes M., Anract P., Leclerc G., Boutin JA., Ferry G. Assessment of some tools for the characterization of the human osteoarthritic cartilage proteome. *J Biomol Tech* 2005;16: 256-65.

84. Ruiz-Romero C., Lopez-Armada MJ., Blanco FJ. Proteomic characterization of human normal articular chondrocytes: a novel tool for the study of osteoarthritis and other rheumatic diseases. *Proteomics* 2005;5:3048-59.

85. Sinz A., Bantscheff M., Mikkat S., Ringel B., Drynda S., Kekow J., Thiesen HJ, Glocker MO. Mass spectrometric proteome analyses of synovial fluids and plasmas from patients suffering from rheumatoid arthritis and comparison to reactive arthritis or osteoarthritis. *Electrophoresis* 2002; 23:3445-56

86. Liao H., Wu J., Kuhn E., Chin W., Chang B, Jones MD., O'Neil S., Clauser KR., Karl J., Hasler F., Roubenoff R., Zolg W., Guild BC. Use of mass spectrometry to identify protein biomarkers of disease severity in the synovial fluid and serum of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2004;50:3792-803

87. Drynda S., Ringel B., Kekow M., Kuhne C., Drynda A., Glocker MO., Thiesen HJ., Kekow J. Proteome analysis reveals disease-associated marker proteins to differentiate RA

- patients from other inflammatory joint diseases with the potential to monitor anti-TNFalpha therapy. *Pathol Res Pract* 2004;200:165-71
88. de Seny D., Fillet M., Meuwis MA., Geurts P., Lutteri L., Ribbens C., Bours V., Wehenkel L., Piette J., Malaise M., Merville MP. Discovery of new rheumatoid arthritis biomarkers using the surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry ProteinChip approach. *Arthritis Rheum* 2005; 52:3801-12
89. An Y., Pu H., He SZ., Li ZG. Identification of biomarkers in serum of early rheumatoid arthritis by proteomic methods *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2005;85:1261-5
90. Tilleman K., Van Beneden K., Dhondt A., Hoffman I., De Keyser F., Veys E., Elewaut D., Deforce D. Chronically inflamed synovium from spondyloarthropathy and rheumatoid arthritis investigated by protein expression profiling followed by tandem mass spectrometry. *Proteomics*. 2005; 5:2247-57
91. Miyamae T., Malehorn DE., Lemster B., Mori M., Imagawa T., Yokota S., Bigbee WL., Welsh M., Klarskov K., Nishimoto N, Vallejo AN., Hirsch R. Serum protein profile in systemic-onset juvenile idiopathic arthritis differentiates response versus nonresponse to therapy. *Arthritis Res Ther* 2005;7:R746-55.
92. Tomosugi N., Kitagawa K., Takahashi N., Sugai S., Ishikawa I. Diagnostic potential of tear proteomic patterns in Sjogren's syndrome. *J Proteome Res* 2005;4:820-5.
93. Stone JH., Rajapakse VN., Hoffman GS., Specks U., Merkel PA., Spiera RF., Davis JC., St Clair EW., McCune J., Ross S., Hitt BA., Veenstra TD., Conrads TP., Liotta LA., Petricoin EF 3rd; Wegener's Granulomatosis Etanercept Trial Research Group. A serum proteomic approach to gauging the state of remission in Wegener's granulomatosis. *Arthritis Rheum* 2005;52:902-910.
94. Fietta A., Bardoni A., Salvini R., Passadore I., Morosini M., Cavagna L., Codullo V., Pozzi E., Meloni F., Montecucco C. Analysis of bronchoalveolar lavage fluid proteome from systemic sclerosis patients with or without functional, clinical and radiological signs of lung fibrosis. *Arthritis Res Ther*. 2006; 8:R160
95. Atzeni F., Bardoni A., Cutolo M., Hunzelmann N., Krieg T., Martini G., Montecucco C., Olski TM., Secchi ME., Valentini G., Zulian F., Sarzi-Puttini P. Localized and systemic forms of scleroderma in adults and children. *Clin Exp Rheumatol* 2006; 24 (S 40):S36-45
96. Denton CP., Black CM., Abraham DJ. Mechanisms and consequences of fibrosis in systemic sclerosis. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2006; 2:134-144
97. Hummers LK. Microvascular damage in systemic sclerosis: detection and monitoring with biomarkers. *Curr Rheumatol Rep* 2006;8:131-137

98. Mason GI., Hamburger J., Matthews JB. Mast cells, extracellular matrix components, TGF β isoforms and TGF β receptor expression in labial salivary glands in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2000; 59:183-189
99. Chisolm DM et al. Labial salivary gland biopsy in Sjogren's syndrome. *Clin Pathol* 1968; 21:656-60
100. Subcommittee for Scleroderma Criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and therapeutic Criteria Committee. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum* 1980; 23: 581-590
101. Peterson GL. Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. *Anal Biochem* 1979; 100: 201-220
102. Baldini C., Giusti L., Bazzichi L., Lucacchini A., Ciregia F., Tavoni A., Bombardieri S.. Analisi Proteomica della saliva nei pazienti con Sindrome di Sjogren primitiva. *Reumatismo* 2006, 58(3)
103. Giusti L, Baldini C, Bazzichi L., Ciregia F., Tonazzini I., Mascia G., Giannaccini G., Bombardieri S., Lucacchini A. Siena Proteomics Proceedings. Proteome analysis of whole saliva: a new tool for rheumatic diseases - the example of Sjögren's syndrome. in press
104. Mirels L., Hand AR., Branin HJ. *J Histochem Cytochem* 1998; 46: 1061-1071
105. Kivela J., Parkkila S., Parkkila AK., Leinonen J., Rajaniemi H. Salivary carbonic anhydrase isoenzyme Vi. *J Physiol* 1999; 520: 315-320
106. Navone R., Lunardi C., Gerli R., Tinazzi E., Peterlana D., Bason C., Corrocher R., Puccetti A. Identification of tear lipocalin as a novel autoantigen target in Sjogren's syndrome. *J Autoimmun* 2005; 25: 229-234.

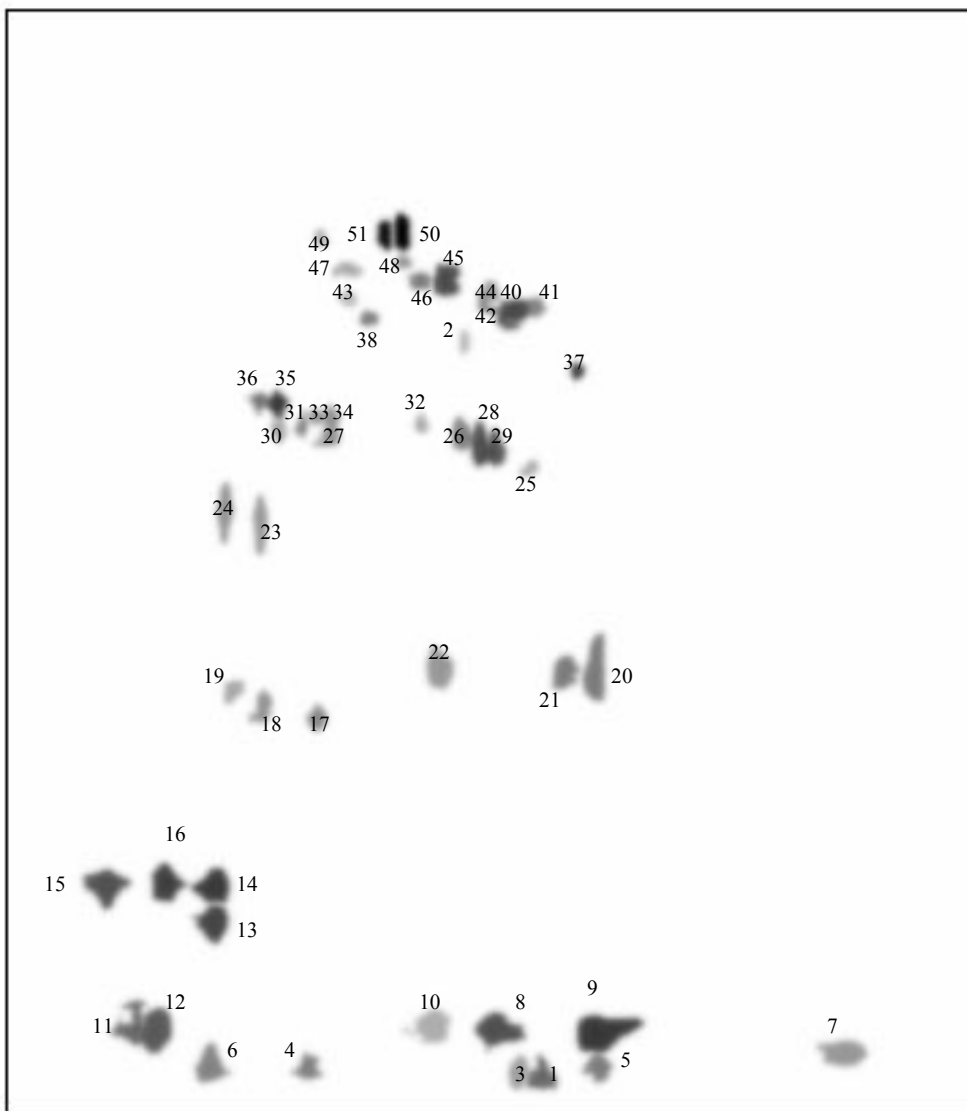


Figura 6: Gel sintetico controllo sano

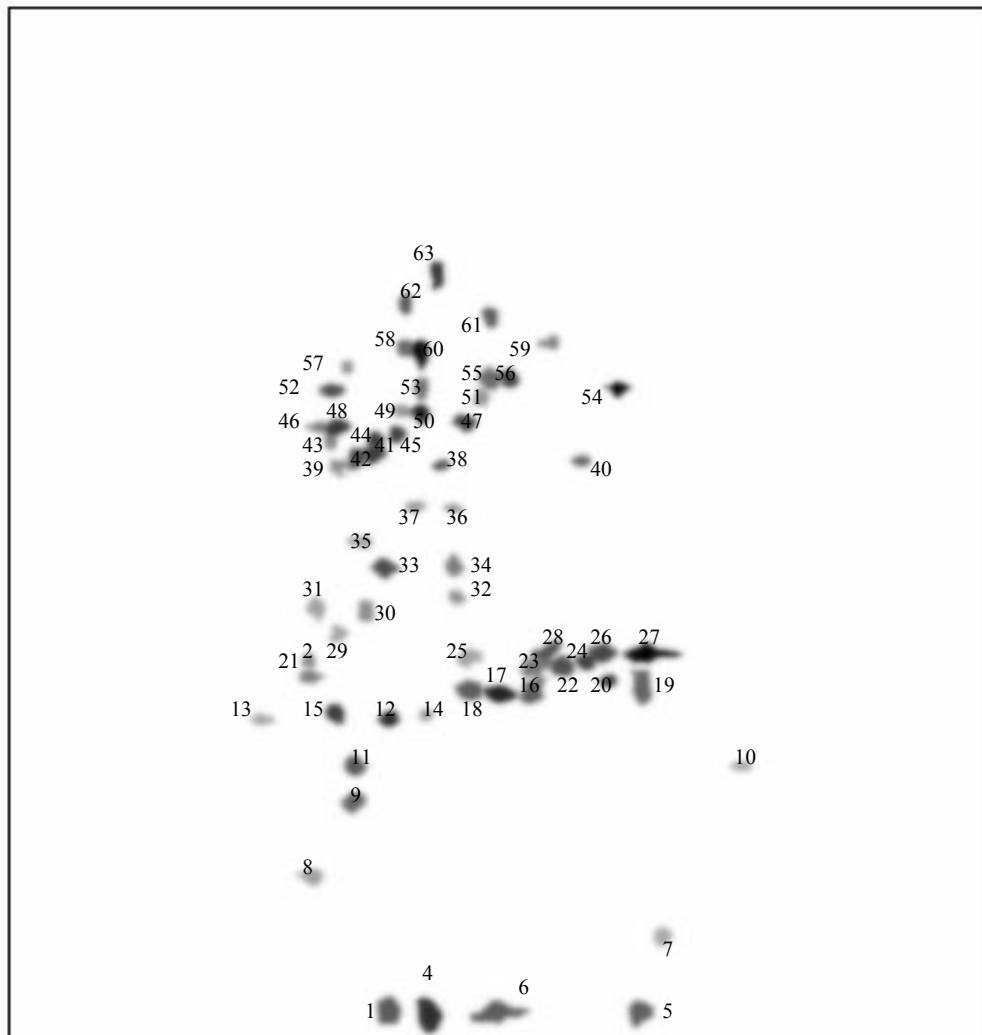


Fig 7: Gel sintetico Sindrome di Sjogren

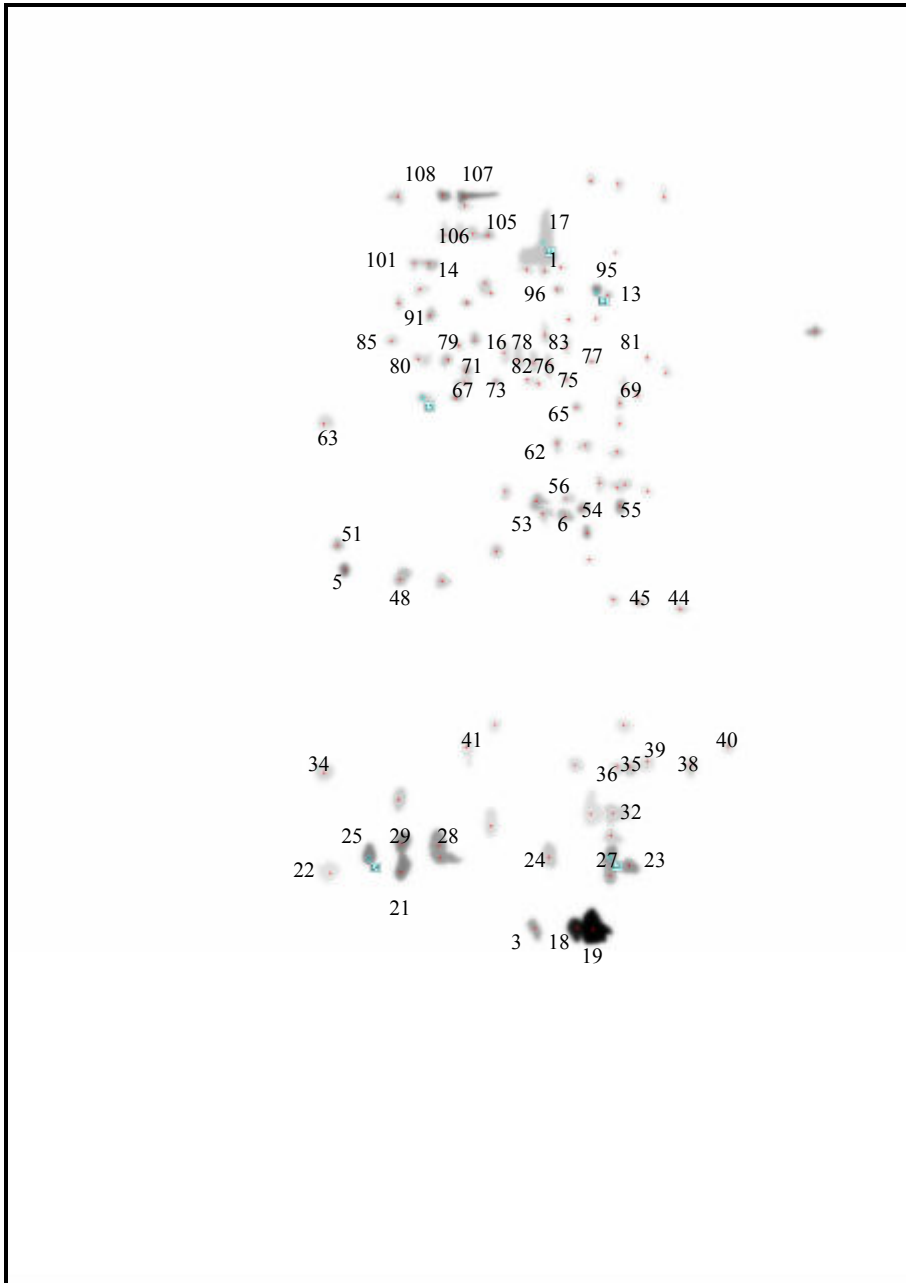


Fig 8: Gel sintetico Sindrome Sicca Idiopatica

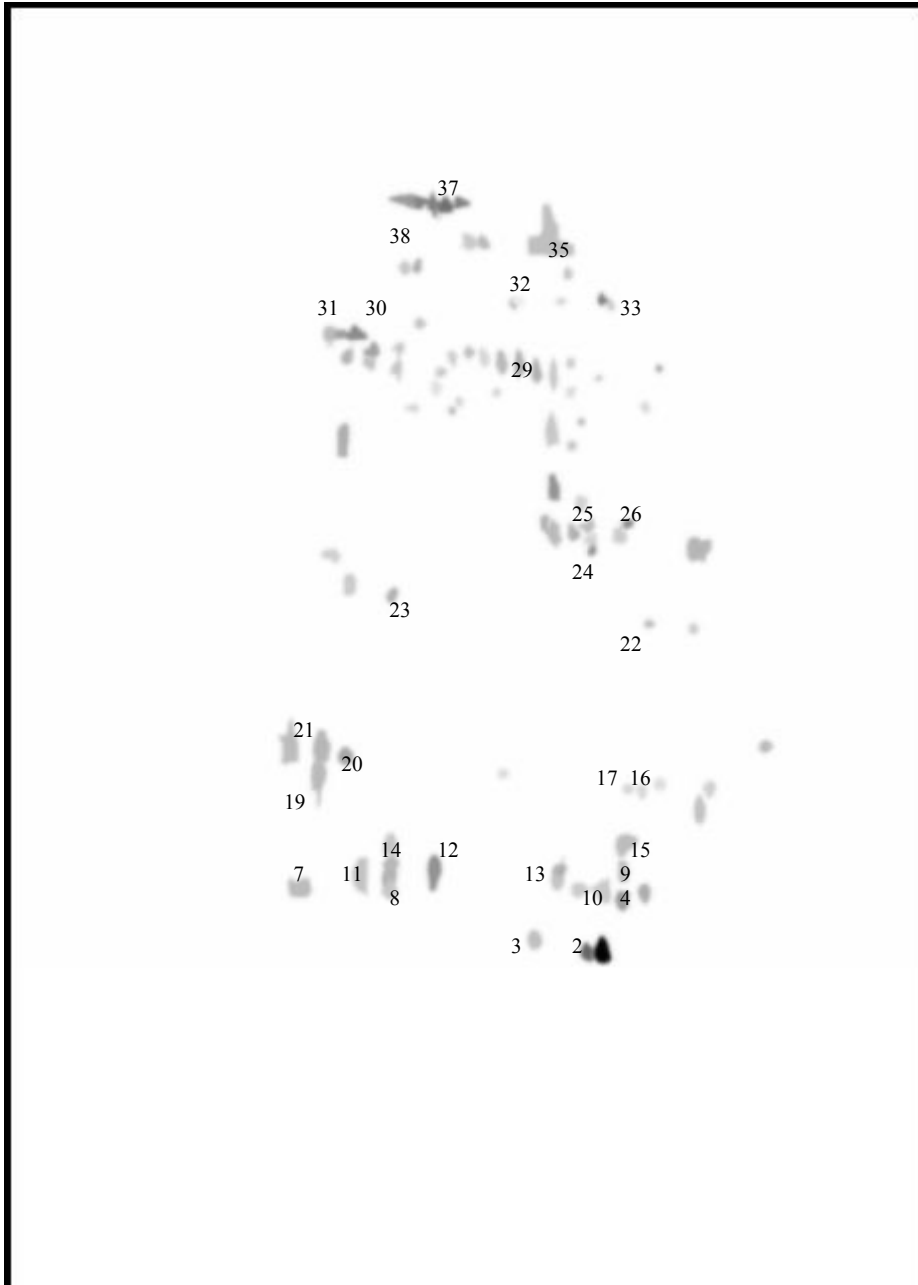


Fig 9: Gel sintetico pazienti con anticorpi anti-Ro/SSA

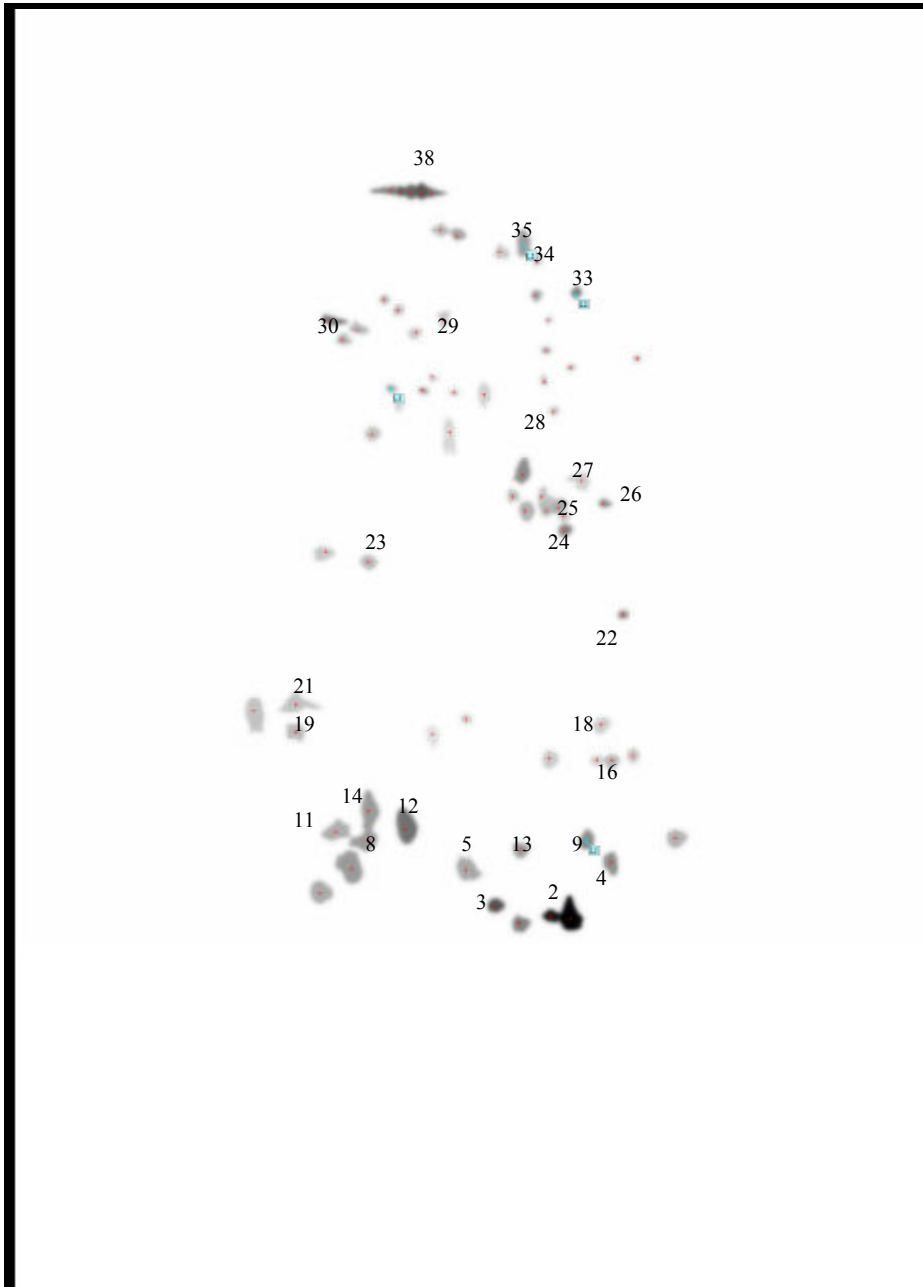


Fig 10: Gel sintetico pazienti con anticorpi anti- Ro/SSA e anti-La/SSB

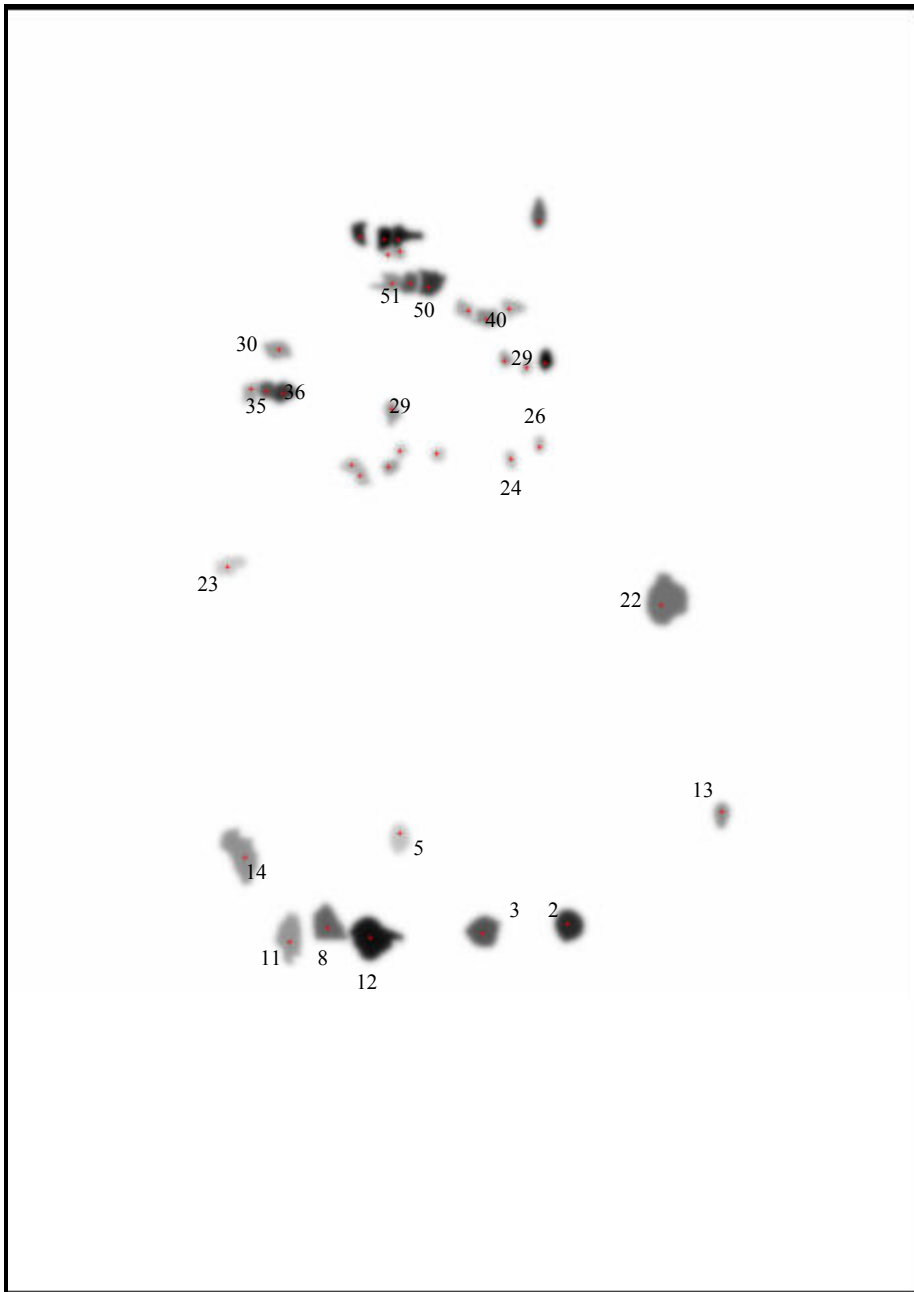


Fig 11. Gel sintetico Sclerosi Sistemica Progressiva

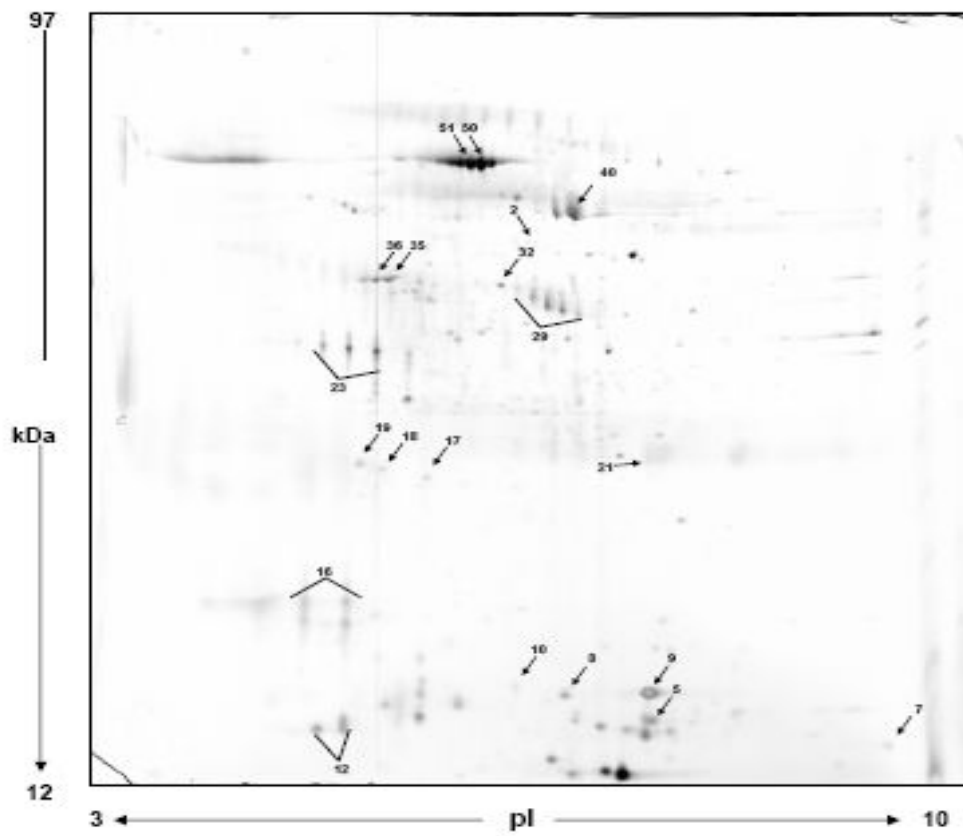


Fig 12: Gel rappresentativo controllo sano

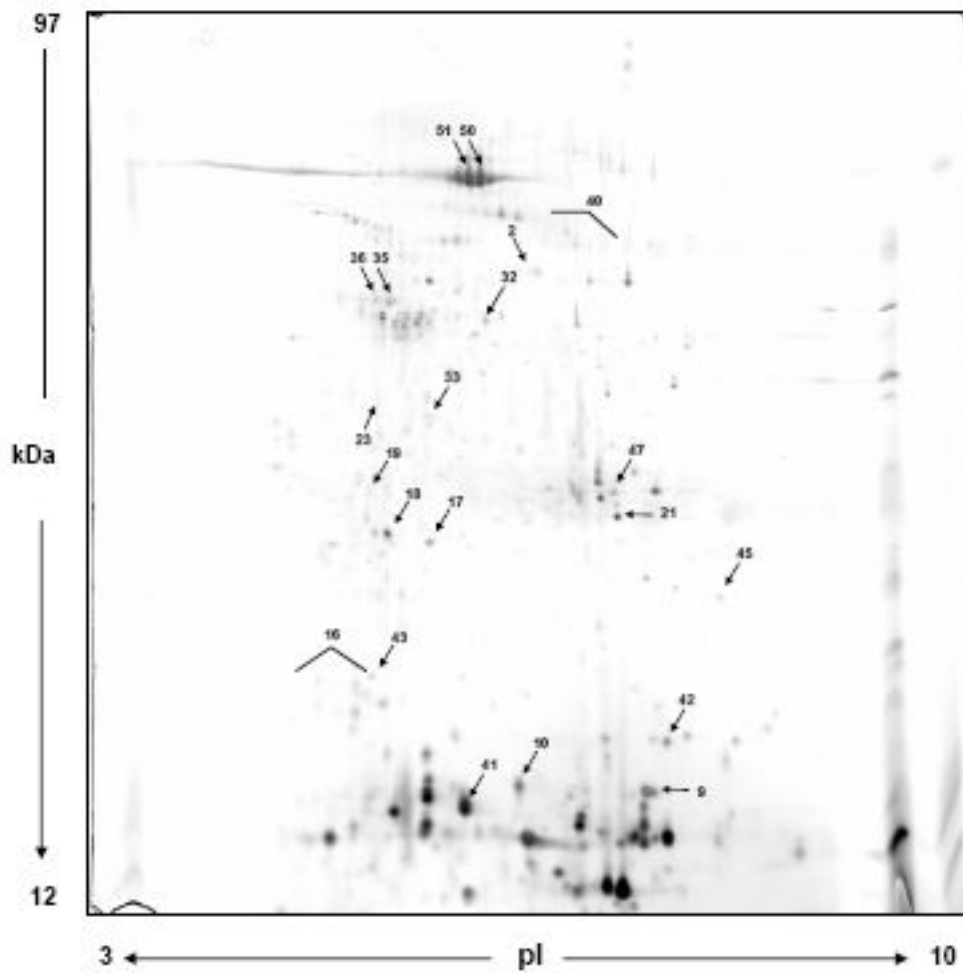


Fig 13: Gel rappresentativo Sindrome di Sjogren

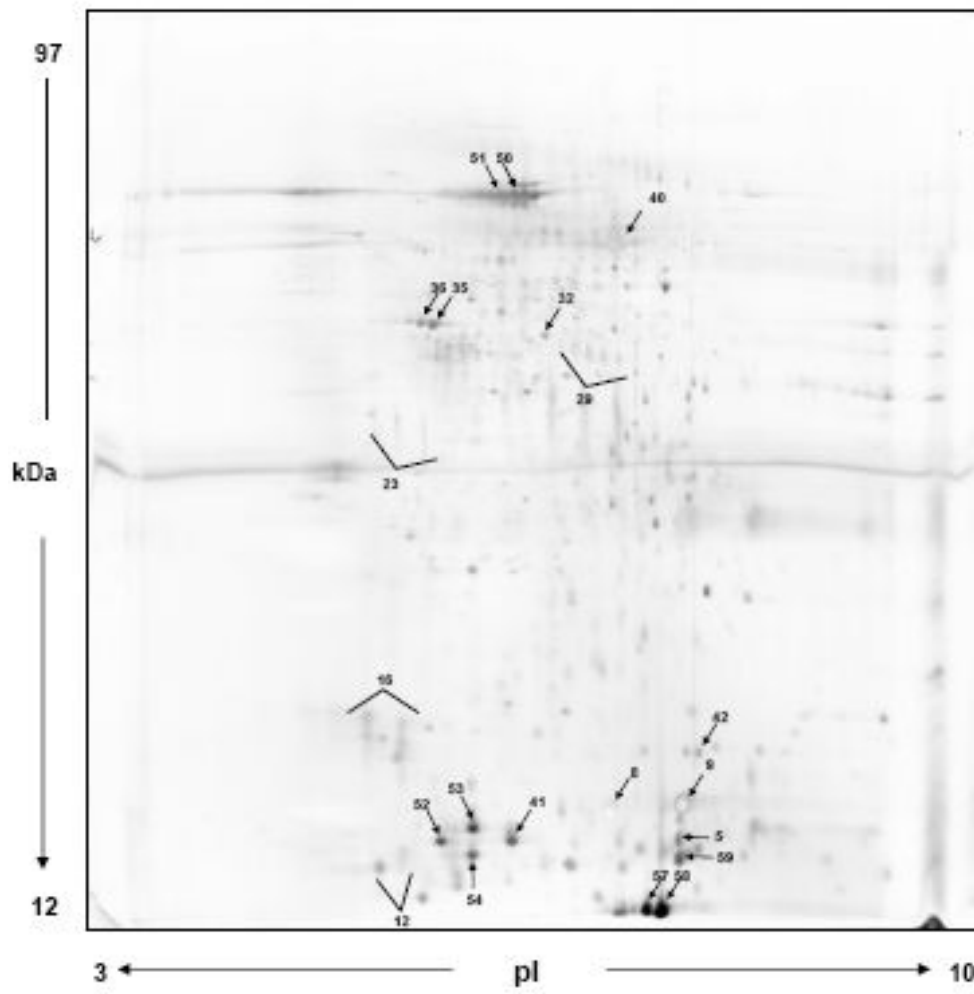


Fig 14: Gel rappresentativo Sindrome Sicca Idiopatica

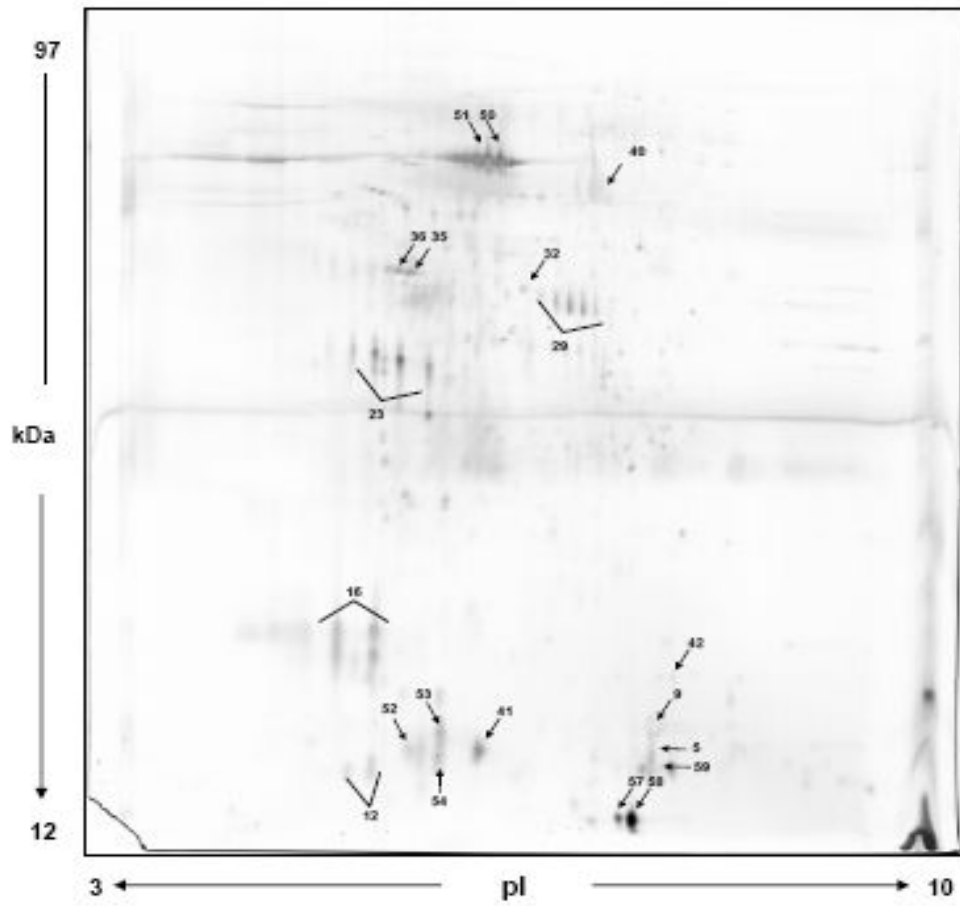


Fig 15: Gel rappresentativo dei pazienti con anticorpi anti-Ro/SSA

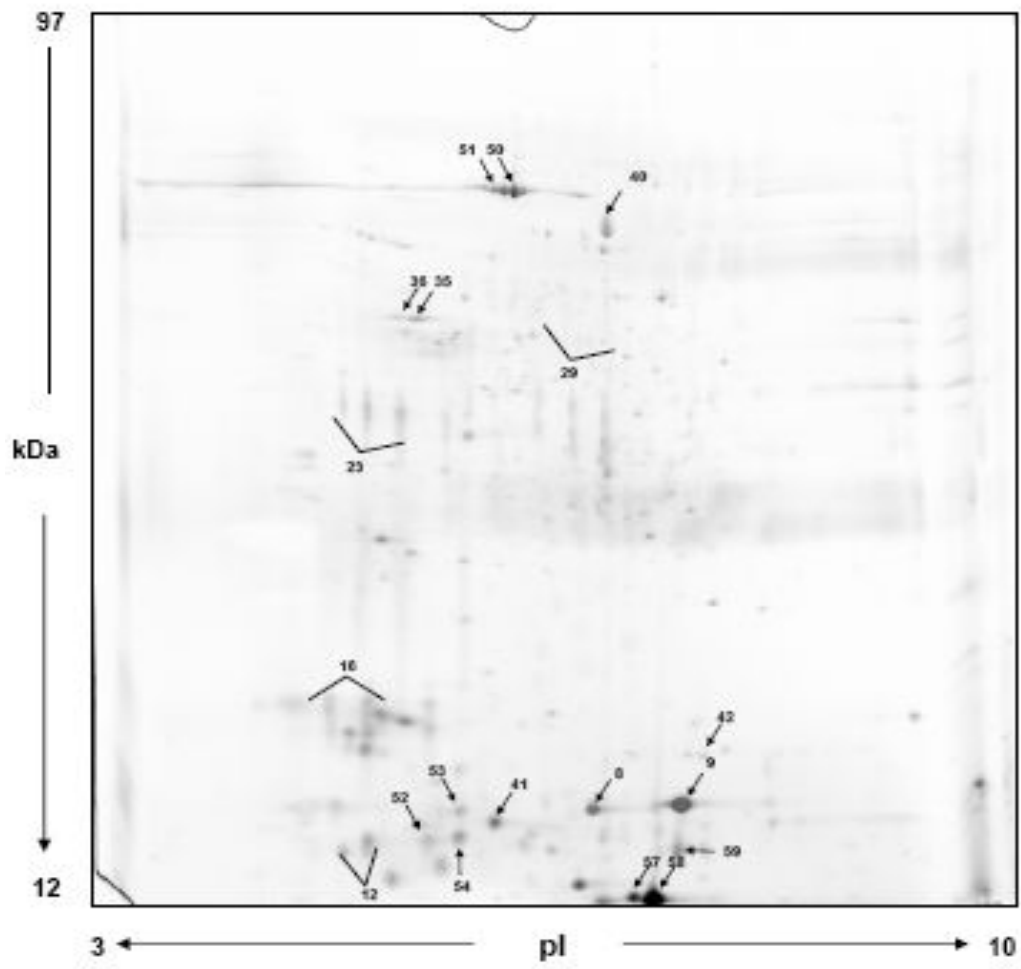


Fig 16: Gel rappresentativo pazienti con anticorpi anti-Ro/SSA e anti-La/SSB

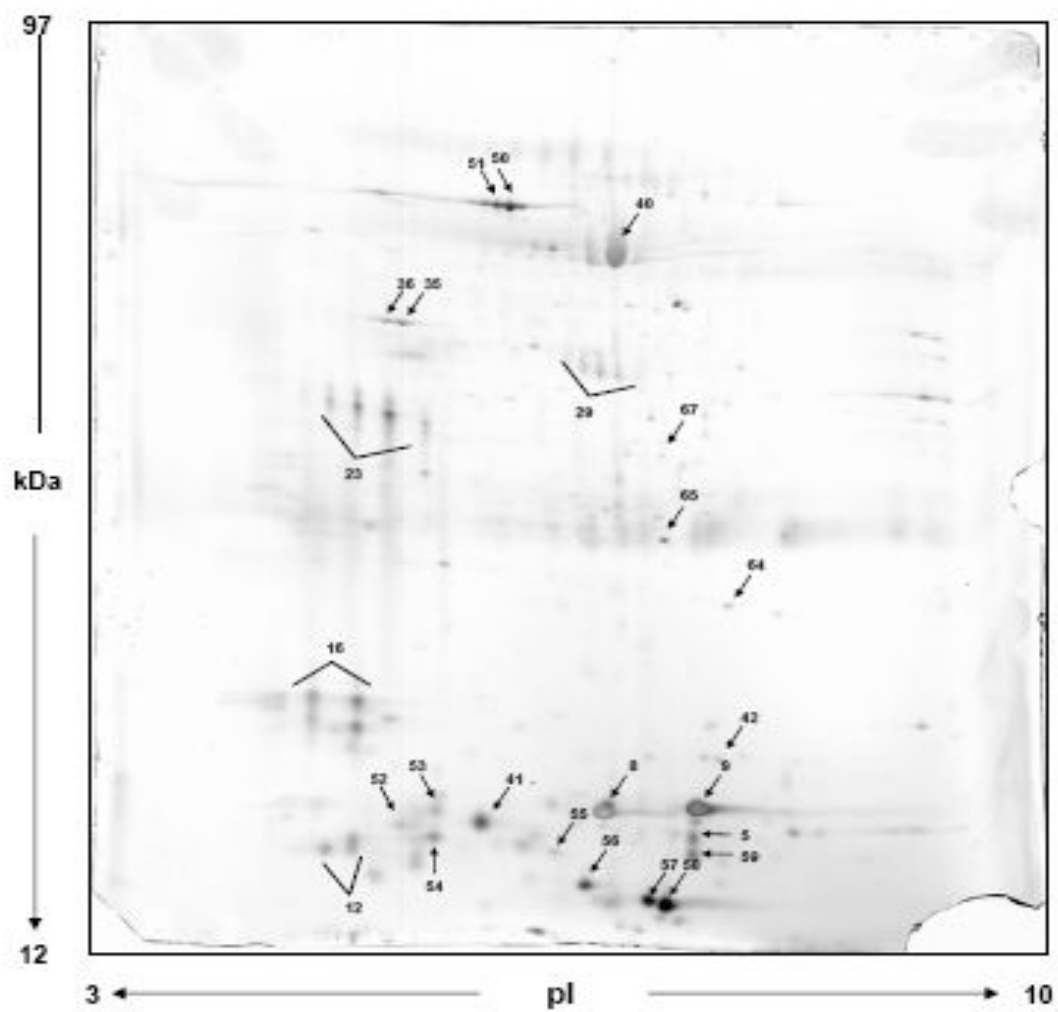


Fig 17: Gel rappresentativo Sclerosi Sistemica Progressiva



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PISA

Facoltà di Medicina e Chirurgia
Dottorato in Fisiopatologia Medica e Farmacologia
Anno Accademico 2005-2006

Tesi di dottorato:

**“Analisi proteomica della saliva
in pazienti affetti da Sindrome di Sjogren primitiva”**

Relatore: Prof. Stefano Bombardieri

Candidato: Chiara Baldini

INDICE:

| | |
|--|-------------------|
| RIASSUNTO | pag. 3-4 |
| I. INTRODUZIONE | |
| Ia. SjS: aspetti epidemiologici, eziopatogenetici, clinici e diagnostici | pag. 5-16 |
| Ib. SjS: modificazioni qualitative e quantitative nella composizione della saliva | pag. 17-18 |
| Ic. La proteomica | pag. 19-26 |
| Id. Applicazioni cliniche dell'analisi proteomica allo studio della saliva | pag. 27-29 |
| II. SCOPO DEL LAVORO | pag. 30-31 |
| III. MATERIALI E METODI | |
| IIIa. Pazienti | pag. 32-33 |
| IIIb. Materiali e strumentazione | pag. 34 |
| IIIc. Raccolta e preparazione del campione | pag. 34-36 |
| IIId. Elettroforesi bidimensionale | pag. 36-42 |
| IIIe. MALDI-TOF | pag. 42-43 |
| IIIf. Analisi statistica | pag. 43 |
| IV RISULTATI | |
| IVa. Analisi dei gel sintetici | pag. 44-50 |
| IVb. Analisi quantitativa delle proteine di interesse | pag. 50-53 |
| V. DISCUSSIONE | pag. 54-57 |
| VI. CONCLUSIONI | pag. 58-59 |
| VII. BIBLIOGRAFIA | pag. 60-68 |
| ALLEGATI | pag. 69-80 |

RIASSUNTO

La Sindrome di Sjogren primitiva (SjS) è una malattia autoimmune sistemica a patogenesi multifattoriale che colpisce in maniera peculiare le ghiandole esocrine salivari e lacrimali. La flogosi cellulo-mediata determina una progressiva compromissione della funzione ghiandolare che si traduce, dal punto di vista clinico, in una tipica sindrome secca caratterizzata da secchezza orale e oculare persistenti.

Scopo del lavoro: considerando la peculiarità della SjS nel coinvolgimento diretto delle ghiandole salivari maggiori e minori, l'ipotesi di lavoro che ha guidato questo studio è stata quella di verificare se il fluido salivare dei pazienti potesse rispecchiare, nella composizione proteica, le alterazioni anatomico-funzionali determinate dalla malattia a livello del tessuto ghiandolare. Scopo del lavoro è stato, quindi, quello di caratterizzare mediante analisi proteomica il profilo proteico salivare di pazienti affetti da SjS e comparare il pattern ottenuto con quello di controlli sani e di un gruppo di controlli "patologici" al fine di identificare eventuali biomarkers di malattia.

Pazienti e metodi: Sono stati arruolati nello studio: 15 pazienti con diagnosi di SjS, formulata in accordo con i Criteri Internazionali validati per la diagnosi di malattia, 15 controlli sani e 30 "controlli patologici" comparabili per sesso ed età. Nell'ambito dei 30 controlli patologici: 15 soggetti risultavano affetti da Sclerodermia sistemica progressiva (malattia autoimmune sistemica in grado di determinare un impegno fibrotico non flogistico delle ghiandole salivari), 6 presentavano una Sindrome Sicca Idiopatica non immunomediata e, 9 soggetti risultavano asintomatici per quanto relativo alla secchezza delle mucose ma erano portatori di autoanticorpi patologici (anti Ro/SSA e anti La/SSB), altamente specifici per la SjS. La caratterizzazione del profilo proteico salivare è stata effettuata combinando l'elettroforesi bidimensionale con la spettrometria di massa (MALDI-TOF mass spectrometry). I campioni sono stati raccolti in condizioni standard, centrifugati a 14000 g per 20 minuti a 4°C per rimuovere materiale insolubile e cellule, opportunamente preparati, e sottoposti ad elettroforesi bidimensionale. La prima dimensione è stata effettuata su strip di 18 cm in cui è presente un gradiente lineare di pH 3-10. La seconda dimensione è stata effettuata su gel di poliacrilammide 12% (20cm×20cm×1,5mm). I gel analitici sono stati colorati mediante Silver staining, mentre i gel preparativi per la spettrometria di massa con il Blu Coomassie Colloidale. Le immagini dei gel sono state acquisite tramite uno scanner (Epson Expression 1680) e analizzate con il programma Image Master 2D Platinum 5.0 dell'Amersham Bioscience. Gli spot di interesse sono stati, infine, identificati mediante MALDI-TOF mass spectrometry.

L'analisi statistica è stata condotta mediante test ANOVA per il confronto delle medie tra più gruppi analizzati simultaneamente e mediante *t*-test per il confronto delle medie dei gruppi a due a due. Un p-value <0.05 è stato considerato statisticamente significativo.

Risultati: Lo studio ha permesso mettere in evidenza numerose differenze tra il pattern proteico salivare dei pazienti con SjS ed i profili proteici salivari dei soggetti sani e dei controlli patologici. In particolare, nei pazienti con SjS è stato possibile osservare una riduzione nei livelli di espressione di alcune tipiche proteine salivari acinari (albumina, α -amilasi salivare, PIP, cheratina 6L, anidrasi carbonicaVI), un'alterata espressione di proteine coinvolte nell'equilibrio proteasi / antiproteasi con una riduzione delle cistatine e dei loro precursori e un incremento dell'inibitore dell'elastasi leucocitaria, un incremento di proteine coinvolte nel danno tissutale (actina, lipocalina-1 precursore) e, infine, un'aumentata espressione di proteine infiammatorie e legate all'autoimmunità (calgranulina B, ciclofillina A, catena leggera κ delle immunoglobuline, beta2-microglobulina).

Conclusioni: Lo studio, seppure preliminare, ha permesso di documentare come il pattern proteico salivare dei pazienti con SjS risulti profondamente alterato e presenti aspetti peculiari che, in parte riflettono l'impegno flogistico selettivo da parte della malattia delle ghiandole salivari, in parte riflettono le alterazioni dell'ambiente orale che essa induce e, in parte, infine, la natura autoimmune sistemica della SjS. L'insieme delle alterazioni osservate suggerisce che il dosaggio dei livelli salivari di un numero limitato di proteine, identificate tramite analisi proteomica, possa costituire un valido ausilio nella diagnosi di malattia, configurando una sorta di algoritmo proteico da applicare soprattutto nei casi che rimangono dubbi nelle indagini di diagnostica tradizionale. Complessivamente, quindi, seppure a livello preliminare, lo studio ha mostrato come l'analisi proteomica di fluidi biologici scarsamente complessi e facilmente reperibili come la saliva possa rappresentare un'ulteriore ausilio nella diagnosi delle malattie reumatiche, in generale, e della SjS in particolare.

I.INTRODUZIONE

Ia. Sindrome di Sjogren: aspetti epidemiologici, eziopatogenetici, clinici e diagnostici

La sindrome di Sjogren (SjS) è una malattia autoimmune sistemica che colpisce caratteristicamente le ghiandole esocrine ed in particolare le ghiandole salivari e quelle lacrimali manifestandosi, clinicamente, con una sindrome secca oculare e orale che deriva dal coinvolgimento anatomico e funzionale delle ghiandole stesse (1).

Dal punto di vista nosografico la malattia può presentarsi in forma isolata (SjS idiopatica o primitiva), oppure in associazione ad altre malattie autoimmuni come l'Artrite Reumatoide, il Lupus Eritematoso Sistemico o la Sclerodermia: si parla in tal caso di SjS secondaria (2).

La SjS primitiva ha una distribuzione ubiquitaria e colpisce preferenzialmente soggetti di sesso femminile (rapporto femmine: maschi = 9:1) con un primo picco di incidenza nella II-III decade di vita ed un secondo picco in età post-menopausale, nella V decade di vita. I dati relativi alla prevalenza e all'incidenza di malattia sono estremamente discordanti e sono condizionati dai criteri classificativi utilizzati nei diversi studi epidemiologici; in tal senso, il tasso di prevalenza della SjS è stimato in un range variabile tra lo 0.15% e il 3.3%, mentre il tasso di incidenza varia da 1: 1000 a 1: 100 a seconda dei diversi studi in esame (3-6). Le discrepanze degli studi epidemiologici condotti sulla malattia possono, almeno in parte essere giustificate dal fatto che criteri classificativi per la SjS primitiva e secondaria, accettati a livello internazionale, sono stati elaborati solo recentemente, nell'ambito dell' American-European Consensus Group nel 2002 (7) (Tabella 1). Utilizzando tali criteri la prevalenza della malattia è stimata pari a circa lo 0.5% nella popolazione adulta (8).

Tabella 1: *American European Consensus Criteria 2002*

| |
|---|
| 1. Sintomi oculari Una risposta positiva almeno ad una delle seguenti domande: Ha sensazione quotidiana di occhi secchi da oltre tre mesi? Ha sensazione di sabbia/corpo estraneo negli occhi? Utilizza lacrime artificiali per più di tre volte al giorno? |
| 2. Sintomi orali Una risposta positiva almeno ad una delle seguenti domande: Ha sensazione quotidiana di bocca secca da oltre tre mesi? Ha tumefazione ricorrente o persistente delle ghiandole salivari? Deve bere molto per inghiottire cibi secchi? |
| 3. Segni Oculari Schirmer test (<5 mm in 5 min) Rosa Bengala positivo |
| 4. Istopatologia Focus score > 1 (Focus: aggregato di almeno 50 cellule mononucleate adiacente ad acino intatto, Focus score numero di foci per 4 mmq) |
| 5. Impegno delle ghiandole salivari Scintigrafia salivare Scialografia parotidea Riduzione del flusso salivare (< 1,5 ml in 15 min) |
| 6. Autoanticorpi Ro-SSA e/o La-SSB |

Per SjS primario:

- Presenza di 4 criteri su sei positivi di cui almeno uno sia rappresentato dall'istopatologia o dalla sierologia
- Presenza di 3 dei 4 criteri "obiettivi" (punti 3 ,4 ,5 ,6)

Per SjS secondario: criteri 1 e 2 + almeno due tra 3, 4 e 5

Criteri di esclusione: radioterapia, HCV, AIDS, linfoma pre-esistente, sarcoidosi, GVHD, uso di farmaci anticolinergici

Dal punto di vista eziopatogenetico la SjS è descritta come un processo sequenziale “multistep” di tipo multifattoriale che sembrerebbe originare dall’interazione tra fattori di predisposizione genetica e agenti esogeni ambientali in grado di innescare risposte autoimmunitarie abnormi, sia da parte dei linfociti T che dei linfociti B, rivolte contro auto-antigeni tissutali; tali risposte sarebbero in grado di sostenere, perpetuare e amplificare il danno tissutale portando ad uno stato infiammatorio cronico e ad una progressiva perdita funzionale degli organi colpiti (2). I fattori di predisposizione genetica suggeriti sono essenzialmente rappresentati dai geni del sistema maggiore di istocompatibilità (HLA). La SjS è, infatti, strettamente associata all’espressione dell’HLA-DR3 e dei geni ad esso correlati B8 e DQ2. Tale associazione è particolarmente forte per i soggetti con SjS che producono anticorpi anti-Ro/SSA (9). Oltre al sistema HLA gli studi più recenti hanno focalizzato l’attenzione su geni polimorfici che codificano per molecole coinvolte fisiologicamente nella risposta immunitaria come il gene dell’IL-10 (aplotipo GCC), il gene del TNF alfa (allele TNF-308A) e il gene della catena alfa del recettore dell’IL4. Altri polimorfismi genici sono stati osservati a carico del gene della lectina legante il mannosio e dei recettori di alcune chemochine, in particolare del recettore CCR5 che lega le chemochine chemoattrattanti delle cellule mononucleari CCL3, CCL4 e CCL5 (10). Anche gli agenti ambientali legati alla patogenesi della SjS sono molteplici ma, in primis, sono chiamati in causa fattori ormonali (ruolo protettivo degli androgeni e pro-infiammatorio degli estrogeni che sembrerebbero contrastare l’apoptosi dei cloni linfocitari auto-reattivi) e numerosi agenti virali scialotropi come il virus di Epstein-Barr (EBV), il virus dell’epatite C (HCV) ed il retrovirus-I della leucemia umana a cellule T (HTLV-I) (10). Negli ultimi anni, il gruppo di Moutsopoulos ha identificato la presenza di RNA virale di Coxsackie virus nelle biopsie delle ghiandole salivari minori di pazienti con SjS e un’omologia di sequenza dell’87% tra un peptide derivato dalla proteina 2B dei Coxsackievirus e la regione 222-229 dell’epitopo lineare maggiore dell’auto-antigene Ro60KD, che è considerato uno degli auto-antigeni più specifici della SjS (11).

Alla luce delle più recenti acquisizioni, anche se l’eziologia della SjS rimane ancora in larga parte sconosciuta, sono stati elaborati diversi modelli patogenetici in grado di spiegare il ruolo dei diversi elementi cellulari nel danno ghiandolare che si verifica in corso di malattia. Il modello patogenetico più largamente condiviso è quello dell’“epitelite autoimmune” secondo il quale le cellule epiteliali rivestirebbero un ruolo cruciale nella formazione degli aggregati linfocitari periduttali (12). La SjS presenta, infatti, un quadro istopatologico caratterizzato da infiltrati linfocitari focali che interessano generalmente la

regione periduttale delle ghiandole esocrine ma che potenzialmente possono colpire qualunque organo e apparato (es. epitelio tubulare renale, epitelio bronchiale, epitelio dei colangioli epatici etc). Tali aggregati originano essenzialmente dalle interazioni tra le cellule epiteliali e le cellule immuni T e B. Gli aggregati linfocitari sono costituiti essenzialmente da linfociti CD4⁺ positivi che presentano essenzialmente un fenotipo memoria (CD45 RO⁺), esprimono il recettore TCR α/β e sono in grado di secernere INF- γ e IL-10. In percentuale minore sono stati evidenziati anche linfociti T CD8⁺ positivi che esprimono l'integrina (CD 103) e che si localizzano in prossimità di cellule epiteliali acinari E-caderina positive. Il rapporto CD4/CD8 a livello degli infiltrati è di 3:1-5:1. I linfociti B costituiscono solo il 20% degli infiltrati, e ancora più rari sono le cellule natural killer ed i macrofagi (complessivamente < 5%). Accanto agli infiltrati T linfocitari è possibile osservare frequentemente anche delle strutture ectopiche che sono analoghe ai centri germinativi e sono costituite essenzialmente da linfociti B, con una piccola percentuale di linfociti T e di cellule follicolari dendritiche. I linfociti B sono organizzati in una 'dark zone' centrale in attiva proliferazione (centroblasti) e in una zona più periferica 'light zone' di centrociti che vanno incontro a processi di selezione per l'espressione in superficie di anticorpi ad alta affinità. La presenza di questi centri germinativi ectopici è stata associata ad una più elevata positività di autoanticorpi anti Ro/SSA ed anti La/SSB, nonché ad un più alto rischio di trasformazione in senso linfoproliferativo (10). Secondo il "modello epitelitico" le cellule epiteliali, una volta attaccate da un ipotetico agente esogeno, si attiverebbero e inizierebbero a secernere elevate quantità di citochine pro-infiammatorie ed ad esprimere alti livelli di HLA DR richiamando in situ le cellule linfocitarie. Le cellule dell'epitelio ghiandolare fungerebbero da cellule presentanti l'antigene (APC) attivando i linfociti che potrebbero, a loro volta, interagire con i linfociti B innescando la risposta autoimmune (12). Un secondo modello proposto per la formazione degli aggregati è quello di una *disregolazione sistemica dei linfociti T circolanti*, ed in particolare dei linfociti Th1 positivi, che migrerebbero attivamente nelle ghiandole esocrine con un processo di homing mediato dall'adesione alle venule ad endotelio alto (HEV) fin dalle prime fasi di malattia. I linfociti Th1, attraverso la liberazione di citochine proinfiammatorie, ed in particolare di INF- γ , attiverebbero essi stessi le cellule epiteliali e le indurrebbero ad esprimere potenti chemoattrattanti in grado di richiamare altri linfociti e di amplificare il processo infiltrativo (13). I chemoattrattanti implicati sarebbero le chemochine, proteine a basso peso molecolare in grado di reclutare e attivare specifiche sottopopolazioni leucocitarie, modificando l'espressione e lo stato di

affinità delle molecole di adesione sulla superficie leucocitaria. Sulla scia di questa ipotesi, studi recenti hanno focalizzato l'attenzione, in particolare, su alcune chemochine INF- γ -indotte come la CXCL10 e la CXCL9, il cui mRNA è risultato up-regolato a livello delle cellule epiteliali dei dotti salivari dei pazienti con SjS rispetto ai controlli. Tali chemochine sarebbero in grado, a loro volta, di amplificare il processo richiamando ulteriori linfociti T CD3+ (14). Chemochine diverse come la CXCL13, chemoattrattanti verso i linfociti B, e il BAFF, citochina della superfamiglia del TNF, sarebbero, invece, coinvolte nella formazione delle strutture ectopiche simil germinative il cui ruolo nella successiva potenziale trasformazione linfomatosa rimane da chiarire (15). Recentemente, è stato ipotizzato, inoltre, che il ruolo dei linfociti B possa essere ancora più complesso dal momento che essi stessi sarebbero in grado di polarizzarsi, fungere da APC e produrre INF- γ , influenzando la differenziazione dei T-helper in senso T-helper 1. Questi dati porterebbero l'attenzione sui linfociti B come primi orchestratori del processo infiammatorio a carico delle ghiandole salivari (16). Comunque abbiano origine gli infiltrati linfocitari, una volta formati, essi comportano una progressiva distruzione dell'epitelio ghiandolare. Il principale meccanismo di distruzione dell'epitelio ghiandolare è rappresentato dalla morte cellulare programmata o apoptosi mediata dal sistema Fas/FasL e dal rilascio di perforina e granzima A (17). Anche se è ancora da chiarire se lo stimolo iniziale per il processo apoptotico sia intrinseco alle cellule epiteliali o sia mediato dai linfociti T, la formazione di blebs di membrana durante l'apoptosi porterebbe alla traslocazione a livello di membrana di componenti auto-antigeniche intracellulari che in questo modo guadagnerebbero l'ambiente extracellulare e potrebbero evocare la risposta auto-anticorpale. Un altro ulteriore meccanismo di esposizione di auto-antigeni endocitari sarebbe la liberazione di esosomi da parte delle cellule epiteliali ovvero di vescicole di membrana risultanti dalla fusione di endosomi e lisosomi. Tale meccanismo è stato osservato in vitro ma non ancora in vivo (2). I meccanismi patogenetici descritti giustificano, in realtà, una distruzione del 50-60% delle strutture acinari con una riserva funzionale residua del 40% (18). L'entità della compromissione della funzione secretoria è molto superiore nella SS rispetto al danno organico, e ciò ha portato ad ipotizzare che altri meccanismi siano coinvolti nella patogenesi della malattia (18). A livello del tessuto ghiandolare residuo, in particolare, alcuni autori hanno ipotizzato una disregolazione del trasporto dei fluidi, sottolineando in particolare una anomala distribuzione dei canali numero 5 dell'acquaporina nelle ghiandole salivari. Nel tessuto ghiandolare dei soggetti con SjS i canali dell'acquaporina, che regolano i movimenti dell'acqua attraverso le

membrane biologiche, sarebbero espressi non solo a livello apicale luminale ma anche a livello basolaterale determinando un ristagno interstiziale dei fluidi e contribuendo al deficit secretivo. Tale anomala distribuzione sarebbe mediata dal TNF- α e da altre citochine pro-infiammatorie prodotte localmente (19). In letteratura sono presenti dati contrastanti in questo senso; secondo altri autori, infatti, la distribuzione e la densità dell'acquaporina 5 nelle ghiandole salivari non differirebbe nei pazienti con SS rispetto ai controlli sani (20). Altri autori, negli ultimi anni, hanno indagato possibili alterazioni del circuito neurosecretorio che regola il funzionamento delle ghiandole esocrine (21). Sul parenchima ghiandolare sono presenti recettori transmembrana di tipo muscarinico, in particolare gli M3, che legano l'acetilcolina e che regolano il trasporto di ioni e di acqua attraverso le membrane cellulari nei dotti ghiandolari. Il numero dei recettori M3 eccede quello delle sinapsi neuronali ed in questo modo l'acetilcolina rilasciata da una terminazione nervosa può stimolare più acini adiacenti a quello direttamente innervato. Le alterazioni funzionali a carico del circuito neurosecretivo riguardano essenzialmente il braccio efferente del circuito, mentre quello afferente rimane integro considerando che il paziente avverte i sintomi legati alla secchezza orale e oculare. Uno dei meccanismi potenzialmente responsabili dell'iposecrezione potrebbe essere rappresentato da un ridotto rilascio di neurotrasmettitori (Ach) a livello delle giunzioni sinaptiche e/o da un'alterata risposta ai neurotrasmettitori a livello post-sinaptico. Durante il processo infiammatorio, citochine pro-infiammatorie come l'IL-1, il TNF-alfa o l'IL-6, possono interferire con il rilascio di acetilcolina da parte delle terminazioni colinergiche, inibendolo. Anche la produzione di secondi messaggeri a livello post-sinaptico è, allo stesso modo, fortemente condizionata in senso negativo dalla presenza di tali citochine, e di conseguenza le cellule ghiandolari appaiono meno responsive ai segnali efferenti (18). Infine, studi recenti hanno evidenziato un terzo meccanismo di alterazione del circuito neurosecretivo legato alla presenza di elevati livelli di anticorpi anti-M3R nei pazienti con SjS in grado di fungere da antagonisti muscarinici e di inibire la contrazione della muscolatura liscia (21). Il blocco del M3R potrebbe interferire con la secrezione ghiandolare anche contribuendo alla traslocazione dei canali dell'acquaporina (20). In conclusione la patogenesi della sindrome di Sjogren rimane ancora in larga parte da chiarire potendo essere legata sia ad un danno organico che ad un danno funzionale dei diversi parenchimi ghiandolari.

A fronte di tale complessità patogenetica il quadro clinico della sindrome di Sjogren è relativamente uniforme, essendo dominato dai sintomi legati alla secchezza delle mucose orale e oculare. Il coinvolgimento degli altri organi e apparati, seppure potenziale, si

manifesta in una minoranza dei pazienti, solitamente nelle fasi più tardive di malattia e con un'intensità clinica generalmente di tipo lieve-moderato (22). La sintomatologia oculare è caratterizzata da quadri di cheratocongiuntivite secca con ipolacrimazione, arrossamento della congiuntiva e sensazione persistente di corpo estraneo nell'occhio. Nei casi più gravi possono insorgere infezioni oculari ricorrenti e possono manifestarsi abrasioni della superficie corneale ed ulcere che possono comportare un deficit del visus (23). La sintomatologia orale è, invece, caratterizzata da una persistente xerostomia con difficoltà nella masticazione, nell'eloquio e necessità di assumere liquidi molto frequentemente. I pazienti possono riferire, inoltre, modificazioni del gusto (es. 'sensazione metallica in bocca', 'bocca amara'), tosse secca, disfagia, disagio nel portare protesi dentarie e, infine, nicturia con disturbi del ritmo sonno-veglia secondaria all'eccessiva assunzione di liquidi durante le ore diurne. Inoltre, a seconda delle casistiche, danni a carico dei processi di mineralizzazione dentaria ed alterazioni della flora microbica orale con aumento relativo dei batteri 'cariogeni' e delle diverse specie di *Candida* sono osservati fin nell'80% dei pazienti (24). All'esame obiettivo la mucosa orale appare eritematosa e asciutta e di solito si osserva la mancanza di saliva sul pavimento della bocca e/o la presenza di saliva particolarmente densa e viscosa in corrispondenza dello sbocco dei dotti delle ghiandole salivari maggiori. La superficie dorsale della lingua è spesso anch'essa arrossata e può presentare atrofia delle papille filiformi e fissurazioni laterali. In un terzo circa dei pazienti, infine, le ghiandole salivari maggiori possono presentare tumefazioni ricorrenti e bilaterali; la tumefazione delle parotidi è la più evidente ma spesso è preceduta da quella delle ghiandole sottomandibolari che, tuttavia, può essere misconosciuta (25). Nell'ambito delle manifestazioni sistemiche la malattia può potenzialmente colpire tutti gli organi e gli apparati. La tabella 2 riassume i principali quadri clinici descritti in letteratura e la loro prevalenza. La complicanza più temibile della malattia è tradizionalmente considerata l'insorgenza di una malattia linfoproliferativa e, in particolare, di un linfoma non Hodgkin a cellule B, che generalmente è un linfoma di basso grado della zona marginale. In realtà, ad oggi, studi trasversali hanno evidenziato come solo il 4% dei pazienti con SjS presenti tale complicanza ed il solo studio prospettico longitudinale che ne ha valutato l'incidenza, ha evidenziato come il 7% di pazienti con SjS abbia sviluppato tale affezione in un follow-up di cinque anni (26, 27). Tuttavia, analizzando le possibili cause di morte nei soggetti con SjS, non si evidenziano differenze statisticamente significative rispetto alla popolazione generale, se non per il rischio legato proprio alle complicanze linfoproliferative che sono responsabili di un eccesso di mortalità pari a 2.53 per 1000

persone-anno (8). Uno studio multicentrico europeo, condotto su 33 pazienti seguiti in 9 centri, ha, pertanto, recentemente cercato di mettere in evidenza le caratteristiche del subset di pazienti a rischio per linfoma, identificando nella presenza di linfadenopatia, vasculite cutanea, ipocomplementemia, coinvolgimento del sistema nervoso periferico, febbre, anemia e linfopenia potenziali fattori predittivi per una prognosi negativa (28). Fatta eccezione per le complicanze linfomatose, la SjS si presenta, invece, in conclusione, come una malattia a carattere relativamente favorevole e scarsamente aggressiva, anche se a decorso lentamente progressivo, nella quale la qualità di vita dei pazienti è condizionata essenzialmente dalla sintomatologia ghiandolare (29).

Tabella 2: *Manifestazioni extraghiandolari e prevalenza*

| Apparato/Organo | Quadri clinici | Prevalenza |
|------------------------|---|-------------------|
| Muscoloscheletrico | Artralgie | 60-70% |
| | Artrite | 10-20% |
| | Mialgie | 30-50% |
| Cardiovascolare | F. di Raynaud | 15%-35% |
| Respiratorio | Xerotrachea | 20%-25% |
| | Afezioni bronchiolari di tipo ostruttivo | 20%-33% |
| | Interstiziopatia polmonare (clinica e subclinica) | 8%-35% |
| Genito-urinario | Nefropatia tubulointerstiziale | 15%-20% |
| | Glomerulonefrite | 2%-5% |
| | Dispareunia | 10%-30% |
| Gastroenterico | Disfagia | 25-30% |
| | Epatopatia autoimmune | 5% |
| Cute | Vasculite cutanea | 10% |
| | Xerosi cutanea | 23%-68% |
| ORL | Ipoacusia | 27% |
| Ematologico | Anemia | 18% |
| | Leucopenia | 18% |
| | Linfopenia | 9% |
| SNP | Multinevrite sensitivo motoria | 2-10% |
| | Neuropatia autonoma | ? |
| Endocrino | Tireopatia | 30% |

Dal punto di vista dei dati di laboratorio, nella SjS, gli esami ematochimici routinari possono documentare un'ipergammaglobulinemia policlonale (80%) ed un rialzo della velocità di eritrosedimentazione in presenza di valori normali o solo modificamente alterati della proteina C reattiva (10). La SjS è caratterizzata anche da un ampio spettro di autoanticorpi non organo specifici che comprendono: anticorpi antinucleari (80%), fattore reumatoide (60-90%), anticorpi anti-Ro/SSA (60-80%) e anti-La/SSB (40-60%). La positività del fattore reumatoide si riscontra in media nel 60% dei soggetti ma una caratteristica peculiare della SjS è che, mentre nel siero è presente il fattore reumatoide di

classe IgM, nella saliva, invece, è evidenziabile un fattore reumatoide di tipo IgA, probabilmente prodotto localmente a livello ghiandolare (10). Gli anticorpi anti-Ro/SSA e anti-La/SSB sono considerati i più specifici per la SjS e fanno parte dei criteri classificativi per la malattia (7). Inoltre, gli anti-Ro/SSA sembrano correlare con l'impegno cutaneo vasculitico mentre gli anti-La/SSB con la tumefazione parotidea ed in genere con l'impegno extraghiandolare sistemico (30, 31). I bersagli antigenici degli anticorpi anti-Ro/SSA e anti-La/SSB sono costituiti da complessi ribonucleoproteici, fisiologicamente localizzati a livello citoplasmatico (70%) o intranucleare (30%). Sono descritte due proteine diverse di tipo Ro: una di 52 kDa e una di 60 kDa, mentre è nota una sola proteina di tipo La di 48 kDa. Il complesso ribonucleoproteico è costituito da RNA a basso peso molecolare (28 - 38 kDa) cui si possono fissare direttamente la proteina Ro 60 kDa (all'estremità 5') o la proteina La 48kDa (all'estremità 3'). La proteina Ro 52 kDa si fissa indirettamente all'RNA utilizzando come intermediario la Ro 60 kDa. La funzione delle molecole Ro e La rimane ancora in larga parte sconosciuta. La proteina La/SSB parteciperebbe ai fenomeni di trascrizione del DNA e nella fattispecie al complesso dell'elicasi ATP dipendente per la formazione dell'ibrido RNA/DNA; inoltre essa interverrebbe nella maturazione e nell'esportazione nel citoplasma dei trascritti dell'RNA polimerasi III. La Ro/SSA favorirebbe invece il trasporto dell'RNA dal nucleo al citoplasma. Nel nucleo la Ro 52 è fissata ad alcuni motivi del DNA e fungerebbe da regolatrice dell'espressione genica; la Ro 60, invece, inibirebbe la trascrizione operata dall'RNA polimerasi III (32). Nell'ambito dell'ampio spettro di autoanticorpi descritti un ruolo ancora controverso sembra essere svolto dagli anticorpi anti- α -fodrina. L' α -fodrina è una proteina di 240kDa che appartiene al citoscheletro cellulare e che è stata identificata in tutte le cellule, incluse quelle dei tessuti ghiandolari. Anticorpi anti- α -fodrina di classe IgG o IgA sono stati evidenziati sia nei modelli murini di SjS che nei pazienti con SjS in percentuali variabili tra il 52% e il 93%. Ad oggi, il significato clinico di questi autoanticorpi rimane ancora da chiarire anche se, poichè l' α -fodrina è associata con pompe e canali ionici di membrana, è stato ipotizzato che gli autoanticorpi anti- α -fodrina possano interferire con il funzionamento delle suddette pompe e quindi con la funzione secretoria delle ghiandole (33).

La diagnosi di SjS si basa sulla combinazione di elementi clinici, sierologici, strumentali e istologici. L'iter diagnostico prevede che la sintomatologia soggettiva del paziente relativa alla secchezza degli occhi e della bocca venga registrata mediante questionario validato

(34). Per l'obiettivazione di tale sintomatologia sono utilizzati test oculari per lo studio del film lacrimale (Test di Schirmer e Rosa Bengala) e test di valutazione morfologica e funzionale delle ghiandole salivari maggiori, quali la scialometria, la scialografia e la scintigrafia salivare. In particolare, il test di Schirmer consente di misurare la secrezione lacrimale utilizzando strisce di carta bibula poste nel fornice congiuntivale inferiore per 5 minuti. Il test è positivo se dopo 5' sono bagnati < di 5 mm della striscia di carta bibula. Il Rosa Bengala, oggi sostituito dal verde di lissamina, è, invece, un colorante specifico per cellule devitalizzate e mucina che, in presenza di un danno dell'epitelio congiuntivale o corneale, si fissa sulle cellule rendendo visibili le lesioni epiteliali (23). Dei test di valutazione delle ghiandole salivari maggiori, la scialometria consente di misurare il flusso salivare (patologico se < a 1,5 min /15 minuti), la scialografia di osservare l'architettura e la configurazione del sistema duttale e, infine, la scintigrafia permette una valutazione funzionale delle ghiandole salivari attraverso la velocità di captazione del pertecnato di sodio marcato con Tc 99m (25). Un ausilio per la diagnosi può essere fornito anche dagli esami di laboratorio ed in particolare dalla ricerca degli autoanticorpi anti-Ro/SSA e anti-La/SSB che sono gli unici inclusi nei criteri classificativi internazionali (7). Nell'algoritmo diagnostico, però, la biopsia delle ghiandole salivari minori rappresenta l'indagine "gold standard" ed è universalmente considerata come il criterio più specifico per la diagnosi di SjS (82-95%) (35). La sensibilità dell'esame è più bassa (75-83%) e la percentuale dei falsi negativi è intorno al 20% (36). L'esame viene effettuato praticando una incisione di 1,5-2 cm tra la linea mediana e la commissura della mucosa buccale del labbro inferiore. L'incisione viene effettuata su mucosa integra e le ghiandole prelevate, una volta incluse in formalina, vengono sottoposte all'attenzione del patologo (25). Allo studio istopatologico la ghiandola può mostrare un diverso grado scialoadenite (37, 38). Una scialoadenite aspecifica di grado lieve o moderato non è considerata sufficiente per la diagnosi di SjS, mentre un quadro di scialoadenite focale con almeno un cluster di 50 linfociti per 4 mm² di tessuto (focus) è compatibile con la diagnosi di malattia, anche in accordo con i criteri internazionali (7). Una distribuzione linfocitaria periduttale è inoltre considerata tipica delle forme di SjS primitivo, mentre la distribuzione perivascolare caratterizza prevalentemente le forme di SjS secondaria (38). L'esame istologico delle ghiandole salivari minori non è esente da limiti. Essi sono legati alla sua invasività, all'andamento fluttuante del grado di infiltrazione nelle ghiandole nonché alla necessità di prelevare un campione di tessuto sufficientemente grande considerando la variabilità inter-ghiandolare dell'infiltrato. Un altro limite dell'esame è la riproducibilità del risultato che è in parte

condizionata dall'area ghiandolare esaminata e dalla qualità tecnica del materiale (36). In conclusione, ad oggi non sono stati identificati biomarkers specifici per la diagnosi di SjS, in grado di permettere di formulare ipotesi prognostiche in merito al suo decorso. Anche se la malattia ha un carattere generalmente benigno, tuttavia, considerando il potenziale rischio linfoproliferativo, è auspicabile che possano essere disponibili mezzi diagnostici sempre meno invasivi e più specifici per la SjS.

Ib. SjS: Modificazioni qualitative e quantitative nella composizione della saliva

La SjS, attraverso il sovvertimento strutturale progressivo delle ghiandole salivari e le alterazioni dei processi riassorbitivi e secretivi, determina una riduzione del flusso salivare e può indurre svariate modificazioni della composizione della saliva stessa.

La valutazione quantitativa del flusso salivare viene effettuata, in accordo con i criteri classificativi internazionali, mediante scialometria basale considerando suggestivi di malattia valori uguali o inferiori a 1.5 ml/15 min (7). In realtà, un recente studio olandese ha evidenziato come la riduzione del flusso salivare sia legata, inizialmente, solo ad una riduzione del flusso delle ghiandole sottomandibolari e sottolinguali e come, solo in una fase più avanzata di malattia, si verifichi anche il coinvolgimento delle parotidi (39). In pratica vi sarebbe una progressione temporale nel coinvolgimento delle ghiandole salivari maggiori con l'interessamento, prima, delle sottomandibolari e delle sottolinguali e, dopo, delle parotidi. Lo stesso studio ha confermato come, nella storia naturale della malattia, la composizione della saliva subisca dei cambiamenti con un aumento della concentrazione assoluta del cloro e del sodio e una riduzione dei fosfati. Questi dati confermano studi biochimici precedenti che, fin da metà degli anni '80, hanno iniziato a descrivere come nella saliva dei pazienti con SjS vi fosse un aumento della concentrazione del sodio e del cloro e anche delle proteine totali, dell'albumina, delle IgG e delle IgA (40, 41). Parallelamente, però, è emerso che, anche se la concentrazione assoluta di tali soluti è aumentata, il loro output/minuto è in realtà ridotto e questo dato sarebbe quello in maggior misura responsabile delle alterazioni del cavo orale descritte in corso di malattia (42). Progressivamente, nel tempo, sono state descritte anche ulteriori modifiche a carico della lattoferrina e della beta-2-microglobulina, del lisozima, delle metalloproteinasi MMP-2 e MMP-9 e della callicreina che risulterebbero aumentate, nonché sono state osservate una riduzione nell'attività dell'amilasi e una riduzione del pH salivare (43-47). Gli studi biochimici finora condotti sulla saliva dei pazienti con SjS non sono completamente confrontabili e omogenei. Il principale limite è legato alla difficoltà nel reperire da tutti i pazienti un quantitativo di saliva sufficiente per poter studiare i diversi analiti. Per ovviare ai problemi della raccolta salivare molti studi sono stati condotti su flusso salivare stimolato o selettivamente prelevato da alcune ghiandole, generalmente le parotidi. La stimolazione consente di ovviare al limite del reperimento del campione, tuttavia, l'aumento del flusso può influenzare la concentrazione di alcune proteine che possono risultare ridotte e modificare il pH salivare, aumentandolo. La valutazione del solo flusso

parotideo, inoltre, può fornire risultati parziali in considerazione dell'apparente impegno più tardivo, da parte della malattia, delle parotidi rispetto alle sottomandibolari e alle sottolinguali (39). I parametri oggi ritenuti più sensibili (0.85) e specifici (0.96) sono la combinazione del flusso sottomandibolare e sottolinguale stimolato e la valutazione della concentrazione salivare parotidea del sodio e del cloro (48). Complessivamente, ad oggi, la scialometria e gli studi biochimici condotti sulla saliva risultano in larga parte poco confrontabili, scarsamente riproducibili e di dubbia utilità diagnostica. E' verosimile che la possibilità identificare specifici biomarkers a livello salivare, espressi in maniera diversa nei pazienti rispetto ai controlli, e negli stessi pazienti a seconda dell'attività di malattia, possa consentire di ottenere uno strumento diagnostico non invasivo di indubbia utilità nella cura della SjS; da qui il crescente interesse verso studi di proteomica volti a caratterizzare il profilo proteico della saliva dei pazienti con SjS, valutando simultaneamente un ampio numero di proteine e a partire da minime quantità di fluido salivare dell'ordine di microlitri.

Ic. La proteomica

Il termine “proteomica”, coniato in analogia con il vocabolo genomica nel 1995, indica lo studio di tutte le proteine espresse da un organismo, tessuto o cellula in un preciso istante. (49). Il proteoma è un’entità dinamica perché non solo cellule di uno stesso organismo esprimono proteine differenti, ma anche lo stesso tipo di cellula, in condizioni diverse (età, malattia, ambiente), è caratterizzato da proteine diverse (49). L’analisi diretta delle proteine, rispetto ad un approccio genomico, consente, quindi, di ottenere informazioni precise sui livelli delle proteine presenti, in quel momento, in una cellula o in un fluido biologico rilevandone, inoltre, le possibili modificazioni post-traduzionali (come ad esempio la fosforilazione), che determinano la funzione delle proteine e che risultano particolarmente importanti nella trasduzione del segnale (50, 51).

Negli ultimi anni la proteomica è progredita con crescente interesse nel mondo scientifico e, al momento, è usata come un moderno strumento nella scoperta di farmaci, per la determinazione di processi biochimici implicati nelle malattie, per monitorare processi cellulari, per caratterizzare sia i livelli di espressione che le modifiche post-traduzionali delle proteine, per ricercare differenze tra fluidi biologici o cellule di soggetti sani e malati e per identificare markers di una malattia e possibili candidati per l’intervento terapeutico (52).

Gli studi di proteomica vengono tradizionalmente distinti in tre aree: la *proteomica funzionale* che permette la caratterizzazione dell’attività, delle interazioni e della presenza di modificazioni post-traduzionali delle proteine, per la descrizione a livello molecolare dei meccanismi cellulari; la *proteomica d’espressione* che fornisce la descrizione dell’intero proteoma di una cellula, organismo o tessuto; la *proteomica strutturale* che ha l’obiettivo di identificare e mappare le proteine presenti a livello degli organuli cellulari chiarendone le interazioni reciproche (52).

Le tecnologie proteomiche, a causa della diversità delle proteine, sono le più varie e integrano metodi biologici, chimici ed analitici; la principale tecnologia utilizzata è, però, la spettrometria di massa (MS) che viene associata a metodi differenti di separazione delle proteine (53, 54). La MS è una tecnica altamente sensibile e versatile per lo studio delle proteine e la combinazione della MS, per l’identificazione proteica, con l’elettroforesi bidimensionale (2-DE), come tecnica separativa ad alto potere risolutivo, è il metodo classico e più utilizzato (52).

L'elettroforesi bidimensionale (2-DE) consente di separare, visualizzare, quantificare ed identificare centinaia di proteine a seconda del loro punto isoelettrico e peso molecolare, in un singolo gel, partendo da campioni di complesse miscele proteiche estratte da cellule, tessuti o altri campioni biologici.

La tecnica, introdotta nel 1975, separa le proteine in due step distinti (Fig.1):

1) la 1° dimensione, *Iso-Elettro Focusing (IEF)*, separa le proteine secondo il loro punto isoelettrico (pI).

2) la 2° dimensione, *l'elettroforesi su gel di poliacrilammide (SDS-PAGE)*, separa le proteine secondo il peso molecolare (PM).

Con la 2-DE si possono separare migliaia di proteine, anche quelle che differiscono per un solo amminoacido o per piccole differenze di pI e/o PM, ed ogni spot ottenuto corrisponde ad una singola specie proteica. Per una buona elettroforesi bidimensionale è essenziale un'appropriata preparazione dei campioni: il processo dovrà risultare in una completa solubilizzazione, disaggregazione, denaturazione e riduzione delle proteine del campione. Per la strategia di preparazione dei campioni è importante considerare lo scopo dello studio, infatti step addizionali possono aumentare la qualità del risultato finale, ma portano anche alla perdita di proteine (55).

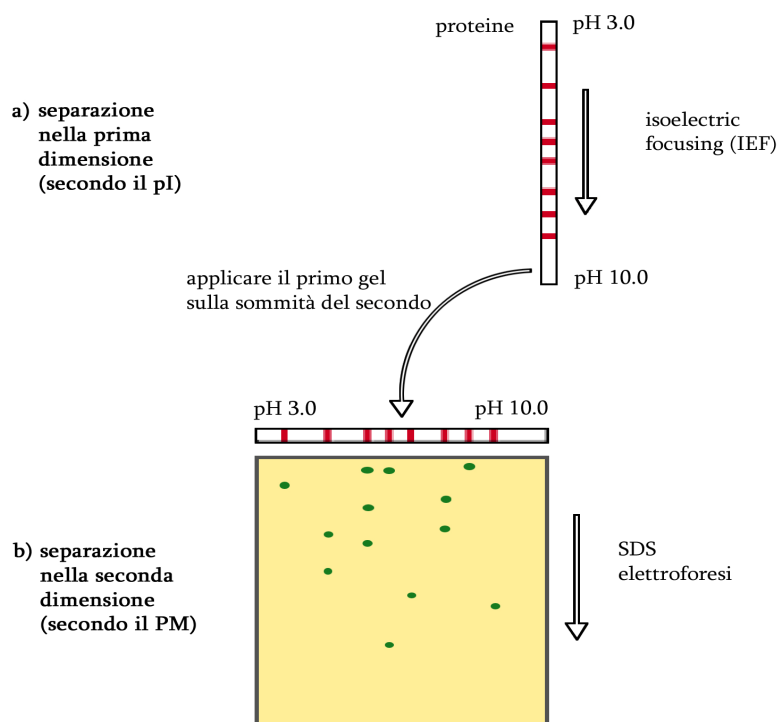


Fig. 1: Elettroforesi bidimensionale.

Prima dimensione

L'IEF è un metodo elettroforetico che separa le proteine secondo il loro punto isoelettrico (pI) utilizzando come supporti delle strip di gel di poliacrilammide. Le proteine sono molecole anfotere: presentano carica netta positiva, negativa o nulla a seconda del pH dell'ambiente in cui si trovano: sono cariche positivamente a pH minori del loro pI e negativamente a pH maggiori. Il punto isoelettrico è il valore di pH al quale la carica netta della proteina è zero. In un gradiente di pH, sotto l'influenza di un campo elettrico, le proteine si muovono fino alla posizione nel gradiente alla quale la loro carica netta è nulla; ad esempio una proteina con carica positiva migrerà verso il catodo, riducendo progressivamente la sua carica positiva, mentre si muove attraverso il gradiente, finché non raggiunge il suo pI. Questo è l'effetto focusing dell'IEF, che concentra le proteine ai loro pI e permette di separarle sulla base di piccole differenze di carica.

La risoluzione del campione è determinata dall'ampiezza del gradiente di pH e dalla forza del campo elettrico. Si utilizzano comunemente voltaggi alti (oltre 1000 V): quando le proteine hanno raggiunto la posizione finale nel gradiente di pH, nel sistema c'è un piccolo movimento ionico che risulta in una corrente finale molto bassa (sotto 1 mA).

L'IEF effettuato in condizioni denaturanti dà la più alta risoluzione ed i risultati migliori.

Originariamente il metodo prevedeva l'utilizzo di tubi di gel di poliacrilammide con gradienti generati da miscele di anfoliti, piccoli polimeri anfoteri che, sotto l'influenza di un campo elettrico, migrano e si allineano secondo i pI, dando un gradiente continuo (Klose J. 1975). A causa delle limitazioni e dei problemi di questi supporti, sono stati sviluppati dei gel a gradiente di pH immobilizzato (IPG), creati incorporando covalentemente un gradiente di gruppi acidi e basici nel gel di poliacrilammide (57). Per le strip sono utilizzate molecole ben caratterizzate, monomeri di acrilammide legati ognuno ad un singolo gruppo basico o acido. Le strip IPG sono prodotte su supporti in plastica usando due soluzioni: una miscela acida ed una basica di monomeri di acrilammide (entrambe contenenti inoltre bisacrilammide e catalizzatori). Le concentrazioni dei gruppi nelle due soluzioni determinano il range di pH del gradiente prodotto (Fig. 2). I gel sono poi lavati, disidratati e tagliati a strisce. In commercio si trovano strip (Amersham Biosciences, Sigma, etc.) di varie lunghezze (7-11-13-18-24 cm) e con vari intervalli di pH (3-10; 4-7; 6-11; 6-9; 3,5-4,5; etc), lineari (L) e non lineari (NL). L'uso delle strip IPG aumenta la riproducibilità e la qualità dei risultati (58).

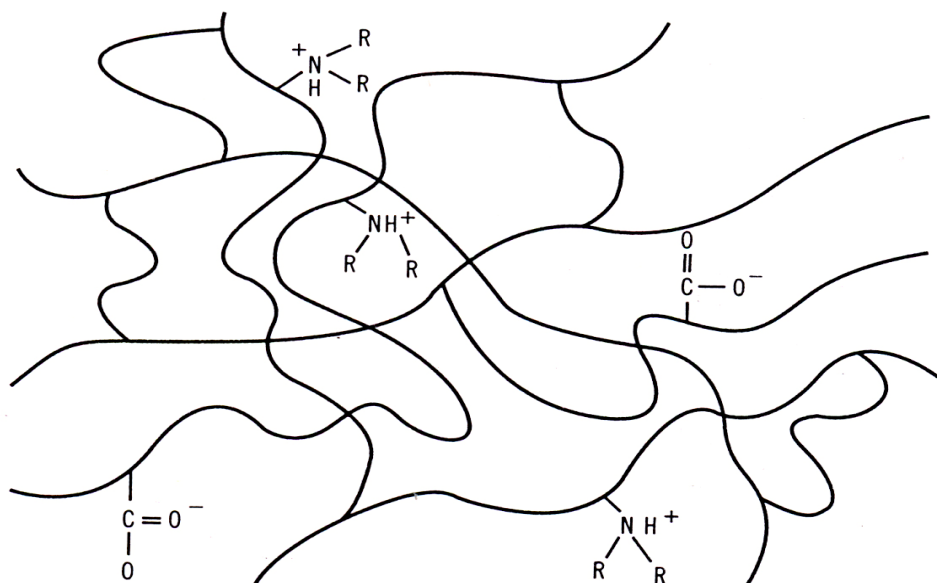


Fig. 2: Rappresentazione grafica della matrice del gel di poliacrilammide con legati i gruppi acidi e basici.

Seconda dimensione

All'IEF segue l'SDS-PAGE, una tecnica elettroforetica che separa i polipeptidi secondo la massa molecolare, utilizzando gel di poliacrilammide. Il sodio dodecil solfato (SDS) è un detergente anionico che in soluzione acquosa stabilizza le molecole proteiche denaturate formando attorno ad esse un guscio di solvatazione (1,4 g SDS/g proteine) che genera micelle dotate della stessa carica elettrica. In questo modo la specifica carica elettrica di una catena polipeptidica viene mascherata dalle cariche negative presenti sulle micelle formate dalle molecole di SDS ed ogni aggregato solubilizzato, proteina-SDS, viene a presentare identica carica negativa per unità di massa. Le particelle anioniche si spostano nel gel di acrilammide, che agisce da setaccio molecolare, separandosi in base al loro peso molecolare mentre migrano in direzione dell'anodo (55).

Per la *visualizzazione dei risultati* possono essere utilizzati molti metodi e le caratteristiche richieste sono: alta sensibilità, ampio range di quantificazione, compatibilità con la spettrometria di massa, bassa tossicità. I metodi più comunemente utilizzati sono il SILVER STAINING o colorazione argentea che è un processo multi-step a vari reagenti molto sensibile (1 ng) o il COOMASSIE STAINING (55). Questo ultimo è circa 50-100 volte meno sensibile (30-50 ng) della colorazione all'argento ma è il solo compatibile con la successiva MS (59).

Le immagini dei gel vengono poi acquisite tramite scanner ed analizzate al computer con software appositi per analizzare complessi campioni proteici separati con l'elettroforesi bidimensionale: un esempio è il software Amersham Biosciences ImageMaster TM 2D Platinum Elite. E' così possibile individuare proteine mancanti o modificate, quantificare gli spot proteici e valutare i cambiamenti nell'espressione proteica in diversi campioni (come controlli vs patologici) (60).

Gli spots proteici di interesse possono essere ulteriormente caratterizzati mediante **spettrometria di massa (MS)**. Uno spettrometro di massa è uno strumento analitico in grado di misurare la massa molecolare di una molecola dopo che essa sia stata ionizzata, ossia dopo che gli sia stata impartita una carica elettrica. Esso è infatti in grado di separare gli ioni molecolari in base al loro rapporto massa/carica. La formazione di ioni di campione in fase gassosa è un prerequisito essenziale per i processi di separazione e di rivelazione tipici di uno spettrometro di massa (61, 62). Esistono molte sorgenti di ionizzazione, ma le più usate nel campo dei peptidi e delle proteine sono la sorgente **MALDI** (matrix-assisted laser desorption/ionization), SELDI (surface enhanced laser desorption/ionization) e la sorgente ESI (elettrospray ionization) (63). La sorgente MALDI, la cui messa a punto risale alla fine degli anni '80, rappresenta una tecnica di ionizzazione "soft" e quindi applicabile a molecole grandi, non volatili o termicamente poco stabili. La tecnica di ionizzazione del MALDI è detta per desorbimento ed è un processo in cui una molecola viene sia evaporata da una superficie che ionizzata. Il campione viene miscelato ad una matrice (di solito acidi organici non volatili, in modo da ottenere un rapporto matrice/campione pari a 10.000:1) e posto, quindi, su un supporto di acciaio dove viene lasciato cristallizzare. La superficie del campione viene bombardata con fotoni ad alta energia derivanti da un raggio laser pulsato (λ 337 nm). L'impatto deposita energia sul campione, direttamente o mediante la matrice, e porta al trasferimento delle molecole campione in fase gassosa ed alla loro ionizzazione. Nel MALDI si assiste ad una ionizzazione per protonazione ossia le molecole catturano protoni caricandosi positivamente (fig 3) (63). La tecnica SELDI, utilizzata a partire dagli anni '90, consente di separare gli analiti in base alla carica di superficie ed è particolarmente utile nell'identificare ioni di bassa massa e di carica basica. Nella ionizzazione per elettro-nebulizzazione (ESI), infine, gli ioni si formano da soluzioni che vengono finemente nebulizzate attraverso un capillare tenuto ad alto potenziale elettrico. Gli ioni dell'analita, nelle goccioline cariche, vengono volatilizzati in seguito alla rimozione del solvente per

evaporazione e diretti, attraverso un sistema di trasferimento ionico, all'analizzatore di massa (64).

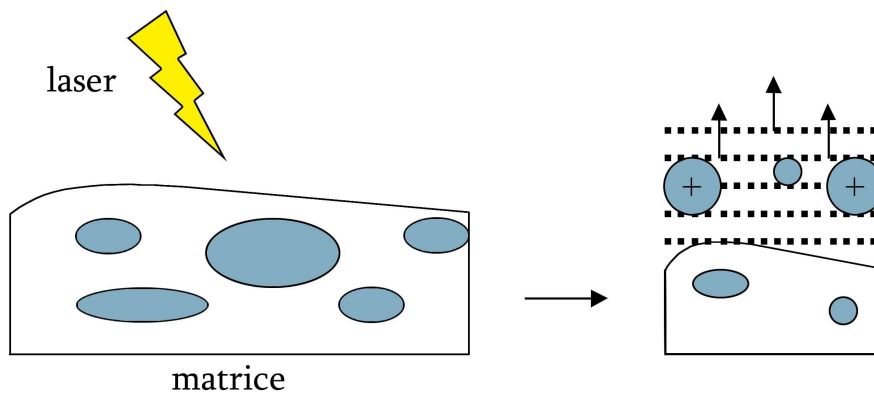


Fig. 3 : MALDI

Una volta ionizzate, le molecole vengono identificate in base al rapporto massa/carica. Il tipo di analizzatore di massa che viene maggiormente usato per l'approccio proteomico classico è il **TOF** (time of flight). Il TOF è essenzialmente costituito da un tubo di lunghezza l nota dove vi è assenza di campo elettrico, ma un'elevata condizione di vuoto. Il vuoto è necessario per permettere agli ioni di raggiungere il detector senza collidere con altre molecole gassose. Queste collisioni potrebbero ridurre la risoluzione e la sensibilità dello strumento e provocare frammentazioni degli stessi ioni. Nel MALDI-TOF un impulso laser desorbe e ionizza le biomolecole. Gli ioni vengono accelerati tramite un voltaggio elevato, acquisendo una velocità che dipende dalla massa: gli ioni leggeri acquisiscono una velocità più elevata rispetto a quelli più pesanti. Entrando in una regione priva di campo elettrico ogni ione mantiene una velocità costante fino a che non raggiunge il rivelatore. Gli ioni di massa differente possono quindi essere separati secondo il tempo: gli ioni più pesanti impiegano più tempo di quelli leggeri. Rilevando il numero degli ioni che arrivano a tempi diversi, è possibile calcolare e visualizzare uno spettro di massa del campione nel quale sono presenti picchi diversi che rappresentano la composizione in ioni con un diverso rapporto massa/carica. Poiché lo stato di carica è solitamente di +1, negli esperimenti di MALDI, è possibile identificare i picchi come rappresentativi delle masse (Fig 4).

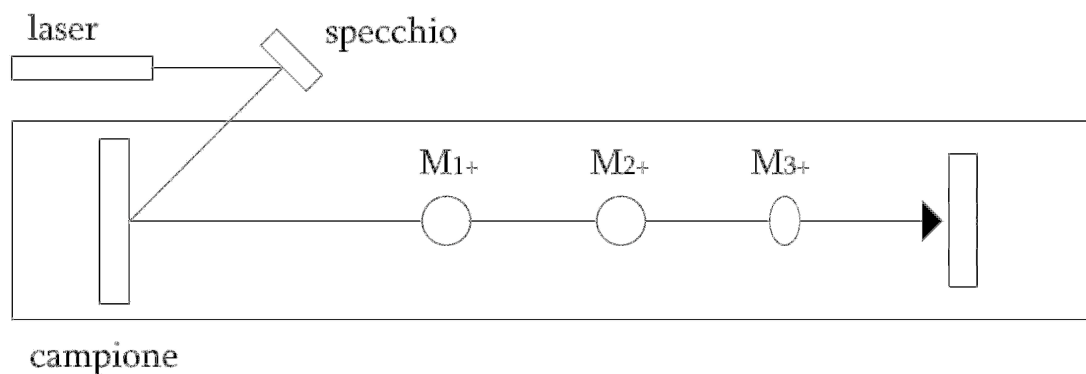


Fig. 4: MALDI-TOF

La MS crea una lista di massa dai peptidi analizzati. Tale lista di massa dei peptidi sconosciuti viene comparata con un database, costituito da proteine note. Comparando la lista di massa dei peptidi della proteina sconosciuta con le liste di massa dei peptidi noti presenti nel database viene effettuata l'identificazione (64) La quantità minima di campione necessaria per l'analisi dipende dalla purezza del campione e di solito è nell'ordine di poche picomoli.

Il vasto range di massa letto, tra 1 e 300 kDa, l'alta accuratezza e la sensibilità rendono il MALDI un metodo d'elezione per l'analisi di tutti i tipi di biomolecole (proteine, acidi nucleici, carboidrati) (65).

In combinazione con l'elettroforesi bidimensionale (e con i database di proteine) il MALDI è particolarmente utilizzato per l'identificazione di spot proteici attraverso 2 approcci principali: la *peptide-mass fingerprinting* (analisi della massa dei digeriti proteolitici) o la *peptide sequencing* (66).

I campioni, di solito, sono separati su un gel e gli spot proteici di interesse sono tagliati e trattati con tripsina, un enzima in grado di rompere i legami peptidici in cui è coinvolto un residuo di arginina o lisina; la miscela di frammenti proteici (peptidi) ottenuta dopo digestione enzimatica è purificata e sottoposta ad analisi di massa. La massa dei peptidi può essere misurata con maggior precisione rispetto a quella delle proteine intatte: i peptidi danno origine ad una library di masse molecolari derivate direttamente dalle proteine, che possono essere identificate con tecniche computazionali e tramite l'utilizzo di database (67). Se la proteina non risulta presente nei database, è possibile ottenere informazioni sulla sequenza dal MALDI con un protocollo di degradazione di Edman modificato: questo è un metodo comune per l'analisi della sequenza delle proteine, che utilizza ripetuti cicli di

rottura dei singoli amminoacidi dal terminale amminico (tramite peptidasi) e successiva identificazione degli amminoacidi staccati con cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC). La miscela di peptidi è analizzata e la sequenza codificata tramite differenze di massa (peptide ladder sequencing) (Fig. 5).

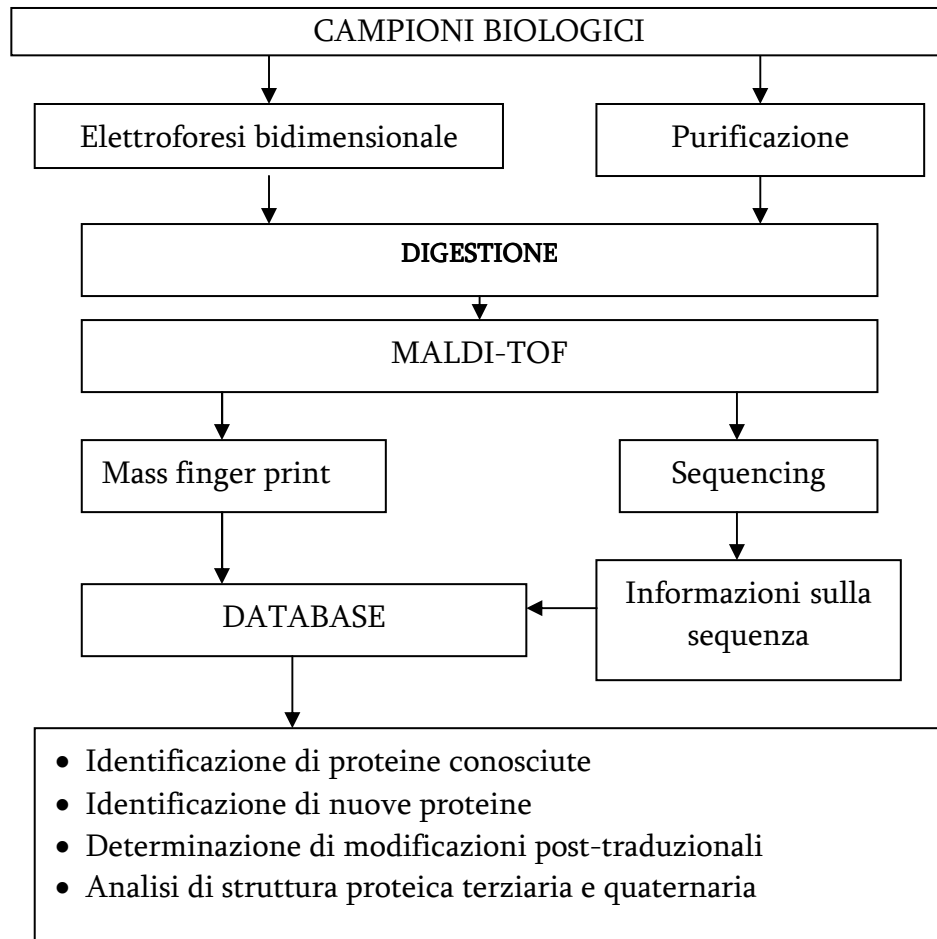


Fig. 5: Schema per l'identificazione di proteine.

Id. Applicazioni cliniche dell'analisi proteomica allo studio della saliva

La saliva in condizioni fisiologiche svolge alcune funzioni fondamentali come: lubrificare e pulire i tessuti orali facilitando il linguaggio, la deglutizione e l'ingestione di cibi; mantenere l'omeostasi nella cavità orale attraverso i tamponi carbonato e fosfato; rimineralizzare i denti con calcio e fosfato; proteggere la superficie dei denti e delle mucose attraverso un'importante azione antimicrobica (lisozima, cistatine, immunoglobuline, lactoferrina, istatine); iniziare la digestione degli amidi grazie all'amilasi salivare (68). La saliva è costituita per il 90% dai fluidi secreti dalle ghiandole salivari maggiori (parotidi, sottomandibolari, sottolinguali) e minori (si trovano nel labbro inferiore, lingua, palato, guance e faringe) e per un 10% è rappresentata dal fluido gengivale crevicolare. La sua composizione è caratterizzata principalmente da acqua (99%), elettroliti ma anche proteine di varia natura (enzimi, mucine, immunoglobuline) (68).

L'analisi della saliva, rispetto ad altri fluidi biologici, offre alcuni vantaggi come il fatto che possa essere raccolta in modo non invasivo da personale con preparazione limitata e senza particolari attrezzature, facilmente anche da pazienti meno collaboranti (bambini, anziani, insufficienti mentali) e che possa fornire un approccio poco costoso per lo screening di grandi popolazioni. I limiti dell'analisi salivare sono, viceversa, rappresentati dall'alta concentrazione di mucine, di residui e di batteri nonché dalla sua alta attività proteolitica (69). La raccolta di saliva direttamente dalle ghiandole che la producono può essere utile per individuare patologie specifiche delle ghiandole, ma oggi, sempre più frequentemente, nella diagnosi delle malattie sistemiche, è la saliva presente nel cavo orale che viene più frequentemente utilizzata; tale utilizzo è in larga parte giustificato dal fatto che la saliva del cavo orale contiene alcuni costituenti del siero che raggiungono le ghiandole salivari per diffusione passiva, per ultrafiltrazione attraverso le giunzioni intracellulari o attraverso il flusso del fluido gengivale (70). Certamente i livelli di certi costituenti serici nella saliva non sono sempre un riflesso dei livelli di questi markers nel siero, ma c'è un crescente interesse nell'uso della saliva e soprattutto nello studio delle proteine salivari per scopi diagnostici, specie nel caso di malattie sistemiche ereditarie, autoimmuni, infettive, nelle neoplasie del cavo orale e per le malattie virali, nonché anche per monitorare i livelli di farmaci, sostanze d'abuso ed ormoni (70, 71). In questo senso, è stato ipotizzato che nella fibrosi cistica, ad esempio, l'antigene carcinoembrionario o la glicosilazione di alcune mucine salivari possano fungere da biomarkers di malattia mentre,

nei pazienti con diabete mellito, la concentrazione salivare di amilasi e IgA salivari risultino aumentate (72).

Negli ultimi cinque anni la ricerca dei biomarkers salivari di malattia è stata potenziata grazie alla tecnologia proteomica che ha permesso di mappare le proteine presenti nella saliva dei soggetti sani analizzando sia il fluido salivare in toto (69, 72-74) che la pellicola salivare adesa ai denti (75), il fluido creviculare (76) e, infine, anche i secreti ghiandolari selettivamente prelevati dalle parotidi, dalle sottomandibolari e dalle sottolinguali (77,78). Il confronto tra il pattern proteico salivare dei soggetti sani e dei malati sta consentendo di rilevare livelli di proteine specifiche che potrebbero essere usati come biomarkers di malattia. E' possibile ipotizzare, con tale approccio, di poter fornire anche informazioni riguardo variazioni semiquantitative sui livelli specifici di ciascuna proteina e rilevare la presenza di isoforme dovute a modificazioni post-traduzionali come fosforilazioni e glicosilazioni. Analisi in questo senso sono già state effettuate per il lichen planus, per alcune neoplasie del cavo orale e della testa e sono in corso per numerose malattie sistemiche (79, 80). Un lavoro preliminare è stato recentemente pubblicato anche per la SjS ma limitatamente all'analisi del secreto parotideo stimolato (81). Questo lavoro, che si colloca nel più ampio panorama delle recenti applicazioni della proteomica allo studio delle malattie reumatiche (Tabella 3), ha messo in luce importanti differenze qualitative e quantitative nei pazienti con SjS evidenziando, in particolare, la riduzione dell'amilasi e della carbonato deidrogenasi e l'aumento dei livelli di alcune proteine come la beta-2-microglobulina, il lisozima C, la cistatina C, la catena immunoglobulinica leggera Igk e il recettore polimerico delle IgG. Alla luce dei risultati incoraggianti finora ottenuti, lo studio delle proteine salivari sembra poter aprire nuovi sbocchi e nuove potenzialità per la ricerca sulle malattie reumatiche, specie nel caso di malattie come la SjS che colpiscono elettivamente le ghiandole salivari.

Tabella 3: *Analisi Proteomica in Reumatologia*

| Malattia | Autore | Materiali |
|---|--------------------------------|---------------------------|
| Osteoartrite | Hermansson M. et al. 2004 (82) | Cartilagine patologica |
| Osteoartrite | De Ceuninck F et al. 2005 (83) | Cartilagine patologica |
| Osteoartrite | Ruiz-Romero C et al. 2005 (84) | Cartilagine patologica |
| Artrite Reumatoide | Sinz A. et al. 2002 (85) | Siero, liquido sinoviale |
| Artrite Reumatoide | Liao H. et al. 2004 (86) | Siero, liquido sinoviale |
| Artrite Reumatoide | Drynda S et al. 2004 (87) | Siero, liquido sinoviale |
| Artrite Reumatoide | de Seny D et al. 2005 (88) | Siero |
| Artrite Reumatoide | An Y et al. 2005 (89) | Siero |
| Artrite Reumatoide, Spondiloartrite, Osteoartrite | Tilleman K et al. 2005 (90) | Sinovia |
| Artrite cronica giovanile | Miyamae T et al. 2005 (91) | Siero |
| Sindrome di Sjogren | Tomosugi N. et al. 2005 (92) | Lacrime |
| Sindrome di Sjogren | Ryu O. et al. 2006 (81) | Saliva (flusso parotideo) |
| Granulomatosi di Wegener | Stone JH. et al. 2005 (93) | Siero |
| Sclerodermia | Fietta A. et al. 2006 (94) | Liquido broncoalveolare |

II. SCOPO DEL LAVORO

Lo scopo di questa tesi è stato quello di caratterizzare il pattern proteico della saliva di pazienti con SjS primitiva utilizzando la tecnologia proteomica. Per lo studio è stato scelto di analizzare il proteoma salivare, inteso come il completo set di proteine presenti nella cavità orale in un dato momento, combinando l'elettroforesi bidimensionale con la spettrometria di massa MALDI-TOF. La scelta della saliva è stata effettuata in relazione al caratteristico impegno clinico delle ghiandole salivari nella SjS, e considerando anche il crescente interesse per la saliva come strumento diagnostico in molte malattie sistemiche; essa, infatti, si configura come un fluido biologico più facilmente reperibile rispetto al siero e con una minore complessità in termini di numero di proteine e variabilità.

I risultati ottenuti sono stati confrontati, in primis, con soggetti sani che presentassero caratteristiche comparabili per sesso e per età.

Successivamente, la popolazione di controllo è stata allargata ad un gruppo di controllo "patologico" eterogeneo con finalità comparative diverse. Sono stati inclusi, allora, nello studio soggetti con xerostomia idiopatica, non affetti da SjS, allo scopo di valutare quali modificazioni del profilo proteico potessero rispecchiare più da vicino le modificazioni del cavo orale imputabili alla secchezza della mucosa orale di per sé. Sono poi stati studiati pazienti con profilo auto-anticorpale analogo ai soggetti con SjS e, nella fattispecie con anticorpi anti-Ro/SSA e anticorpi anti-Ro/SSA + anti-La/SSB, ma non affetti da xerostomia, allo scopo di valutare se esistessero eventuali correlazioni tra il profilo auto-anticorpale e le modificazioni nei livelli di proteine espresse. Infine, sono stati considerati pazienti affetti da un'altra malattia immunomediata capace di coinvolgere, anche se con meccanismi diversi, le ghiandole salivari: la Sclerodermia. La Sclerodermia è una connettivite sistemica, a patogenesi autoimmune, caratterizzata da una progressiva fibrosi che coinvolge la cute e gli organi interni (polmone, tratto gastroenterico, rene, cuore) (95). La malattia è provocata da una incontrollata proliferazione del tessuto connettivo e della matrice extracellulare ad opera dei fibroblasti cui si associano alterazioni vascolari localizzate soprattutto a livello del circolo arterioso più periferico (96, 97). Nella storia naturale della malattia è descritto un potenziale coinvolgimento delle ghiandole salivari di tipo fibrotico direttamente legato alla malattia. L'analisi di tipo istopatologico delle ghiandole salivari di pazienti con Sclerodermia ha, infatti, documentato un aumento del numero delle mast-cellule tissutali nonché un incremento nell'espressione delle isoforme del TGFβ2 e β3 a livello dei fibroblasti ghiandolari; elementi cellulari entrambi coinvolti nei

processi fibrotici (98). Poiché la Sclerodermia può, tuttavia, presentarsi in associazione alla SjS (95) ed è possibile, in questo caso, che i pazienti presentino un coinvolgimento delle ghiandole salivari legato alla sindrome di Sjogren secondaria, nello studio questo ultimo gruppo di pazienti è stato escluso. In conclusione, il gruppo di controllo patologico è risultato costituito da:

- a. soggetti con xerostomia idiopatica
- b. soggetti affetti da Sclerodermia
- c. soggetti asintomatici con anti-Ro/SSA
- d. soggetti asintomatici con anti-Ro/SSA e anti-La/SSB

Il confronto dei patterns proteici tra i diversi subset di soggetti arruolati nello studio ha avuto come obiettivo principale quello di evidenziare le alterazioni qualitative e quantitative peculiari solo dei pazienti con diagnosi di SjS primitiva, nel tentativo di isolare biomarkers specifici di malattia che avessero una potenziale valenza diagnostica per la SjS primitiva. Nell'ambito degli obiettivi secondari si è cercato di giustificare tali alterazioni alla luce delle più recenti acquisizioni eziopatogenetiche e cliniche disponibili per la malattia.

III. MATERIALI E METODI

IIIa. Pazienti

Nello studio sono stati arruolati 15 pazienti di sesso femminile ed età media $49,38 \pm 12,54$ ($M \pm DS$), affette da SjS primitiva e seguite presso l'U.O di Reumatologia dell'Università di Pisa. La diagnosi è stata formulata, nella totalità dei casi, in accordo con i più recenti Criteri Americani ed Europei per la malattia (7). La sintomatologia soggettiva dei pazienti, relativa alla secchezza oculare e all'impegno delle ghiandole salivari, è stata raccolta mediante apposito questionario validato. Per l'obiettivazione della secchezza oculare sono stati eseguiti nella totalità dei casi test di Schirmer e Rosa Bengala (o verde di lissamina) ed in tutti i casi sono stati determinati il profilo bio-umorale (comprensivo dell'elettroforesi proteica) e la ricerca degli autoanticorpi non organo specifici. In particolare, la ricerca degli anticorpi antinucleari, degli anti-Ro/SSA e anti-La/SSB e del fattore reumatoide è stata effettuata, rispettivamente, mediante immunofluorescenza su Hep2, contro-immunoelettroforesi e nefelometria. Infine, i soggetti sono stati sottoposti a biopsia delle ghiandole salivari minori la cui lettura è stata effettuata secondo il grading di Chisolm e Mason (99). Le caratteristiche cliniche e sierologiche delle pazienti sono riassunte nella tabella 4. In tutti i pazienti è stata esclusa un'infezione da virus HBV and HCV, virus scialotropi in grado di determinare una flogosi ghiandolare.

Il gruppo di controllo di soggetti sani è risultato costituito da 15 soggetti sani comparabili per sesso e per età con i pazienti arruolati ($45,83 \pm 17,38$; $M \pm DS$). Lo studio è poi stato allargato a 6 soggetti con sindrome secca idiopatica ($65,16 \pm 6,24$; $M \pm DS$), 6 pazienti con anticorpi anti-Ro/SSA ($38,4 \pm 9,45$; $M \pm DS$), 3 con anti-Ro/SSA ed anti-La SSB positivi senza sindrome secca ($42,33 \pm 7,63$; $M \pm DS$) e 15 pazienti con Sclerodermia diffusa e profilo autoanticorpale omogeneo positivo per anti-Scl 70 (età media $49,5 \pm 10$) ($M \pm DS$). La definizione di sindrome secca idiopatica è stata attribuita a soggetti con xerostomia apparentemente non attribuibile alle più comuni cause virologiche o farmacologiche, con profilo auto-anticorpale negativo e biopsia delle ghiandole salivari con grading di Chisolm Mason ≤ 2 . Nei soggetti asintomatici carrier di autoanticorpi la positività degli autoanticorpi anti Ro/SSA e anti La/SSB è stata confermata in almeno due successive determinazioni. La diagnosi di Sclerodermia, infine, è stata definita in accordo con i criteri classificativi internazionali (100). Sono stati esclusi dallo studio soggetti fumatori. Per l'inclusione nello studio tutti i partecipanti hanno rilasciato un consenso informato.

Tabella 4. *Caratteristiche clinico-sierologiche dei pazienti con SjS in studio*

| Caratteristica | Percentuale |
|---|--------------------|
| Xerostomia | 100% |
| Xeroftalmia | 100% |
| Test oculari (Schirmer o Rosa Bengala) | 100% |
| Uso quotidiano lacrime artificiali | 100% |
| Sensazione di sabbia negli occhi | 75% |
| Necessità di bere frequentemente nella giornata | 50% |
| Tumefazione ghiandole salivari maggiori | 15% |
| Biopsia ghiandole salivari positiva | 80% |
| FAN Hep2>1:160 | 85% |
| Anti-Ro/SSA | 75% |
| Anti-La/SSB | 25% |
| Ra test | 60% |
| Ipergammaglobulinemia | 80% |

IIIb. Materiali e Strumentazione

L'acqua, di grado analitico, è stata filtrata mediante l'apparecchio MilliQ (PS Whatman®, Millipore Corporation, Maid Stone, England).

Tutti i reagenti e i solventi sono stati acquistati dalle più comuni fonti commerciali.

Sono state utilizzate strip Immobiline™ DryStrip pH 3-10 L, di 18 cm, e le Ettan™ IPGphor™ Strip Holder, in ceramica, dell'Amersham Biosciences (Uppsala, Sweden).

L'apparecchio impiegato per l'isoelettrofocalizzazione è stato l'Ettan™ IPGphor™ Isoelectric Focusing System (Amersham Bioscience). Per fare i gel è stato utilizzato il Protean Plus Multicasting Chamber (Biorad).

L'apparecchio per l'elettroforesi usato è il Protean II XL Ready Gel (Biorad) con alimentatore EPS 601 Power Sully (Amersham Bioscience).

IIIc. Raccolta e preparazione del campione

I campioni di saliva dei soggetti sono raccolti tramite sputo, senza stimolazione chimica, al mattino e a digiuno. Per minimizzare la degradazione proteica, i campioni sono stati mantenuti in ghiaccio e trattati immediatamente. Da ogni soggetto sono stati ottenuti 1-2,5 ml di saliva che sono stati centrifugati a 14000 g per 20 minuti a 4°C per rimuovere materiale insolubile e cellule.

Nella preparazione il campione di saliva (già centrifugato per eliminare il materiale insolubile) viene addizionato ad acido tricloroacetico (TCA) al 20% e ditiotreitolo (DTT) allo 0,1% (1 ml di TCA per 1 ml di saliva: concentrazioni finali TCA 10% e DTT 0,05%) e le proteine vengono lasciate precipitare in ghiaccio per 30 minuti. Al termine del periodo di incubazione la sospensione è centrifugata a 14000 g per 10 minuti a 4°C. Il sovrantante viene eliminato, mentre il pellet ottenuto è risospeso con ultraturax in 2 ml di acetone a 4°C, quindi centrifugato a 14000 g per 15 minuti. Questa operazione di lavaggio con acetone freddo viene ripetuta altre due volte al fine di eliminare il TCA. Gli eventuali residui di acetone sono eliminati tramite evaporazione ed il pellet finale, che contiene le proteine presenti nella saliva, viene processato per effettuare la prima dimensione. Il pellet proteico è risospeso nella soluzione di reidratazione. La soluzione di reidratazione utilizzata è composta da:

Urea 7M – Thiourea 2M: servono per solubilizzare e denaturare le proteine così che siano presenti in una sola configurazione;

Chaps 4%: è un detergente non ionico che permette di solubilizzare le proteine idrofobiche e minimizzare l'aggregazione proteica;

Ditiotreitolo (DTT) 60mM: agente riducente, serve per rompere ogni ponte disolfuro e permettere alle proteine di distendersi completamente;

Blu di Bromofenolo 0,002%: per seguire la corsa, se il tracciante non migra all'anodo non c'è flusso di corrente;

Anfoliti (3-10) 0,5%: aumentano la solubilità delle proteine minimizzando la loro aggregazione dovuta ad interazioni carica-carica.

I campioni devono rimanere in tale soluzione 30 minuti, a temperatura ambiente, per ottenere una completa denaturazione e solubilizzazione. Una piccola aliquota del campione viene utilizzata per la determinazione della concentrazione proteica tramite il metodo RC/DC della Biorad (Peterson GL.), il volume restante viene utilizzato per la prima dimensione. Per i gel analitici le aliquote contengono 150 µg di proteine e vengono portate sino ad un volume finale di 350 µl con la soluzione di reidratazione. A questo punto i campioni possono essere utilizzati per la prima dimensione o congelati a -80°C ma in tal caso gli anfoliti sono omessi e vengono addizionati solo al momento della prima dimensione.

Dosaggio proteico RC/DC/BIORAD

Il DC protein assay è un dosaggio colorimetrico con cui viene costruita una curva di riferimento utilizzando una proteina standard che dovrà essere preparata nello stesso tampone del campione proteico di interesse. In questo caso la proteina standard albumina bovina, è risospesa nella soluzione di reidratazione. Vengono preparate quattro concentrazioni (con un volume di 25 µl) di proteina standard (0.2-0.4-0.8-1.5 mg/ml) che abbracciano l'intervallo di sensibilità del metodo (Tab.5).

Tabella 5. *Diluizioni della BSA per la retta di taratura.*

| | Rehydration | BSA | Concentrazione | µg BSA |
|--------|-------------|---------|----------------|--------|
| Bianco | 25µl | - | 0 µg/µl | 0 µg |
| 1 | 21,7µl | 3,3µl | 0,2 µg/µl | 4 µg |
| 2 | 18,3µl | 6,7µl | 0,4 µg/µl | 8 µg |
| 3 | 11,7 µl | 13,3 µl | 0,8 µg/µl | 16 µg |
| 4 | - | 25 µl | 1,5 µg/µl | 30 µg |

Per il dosaggio proteico del campione incognito si procede con una diluizione 1:10 o 1:5 dello stesso (si valuta sulla base del volume di soluzione scelto per la risospensione del campione) con la soluzione di reidratazione per avere un volume finale di 25 µl.

Il dosaggio viene effettuato in eppendorfs, in doppio; come bianco viene dosata la soluzione di reidratazione, a temperatura ambiente.

Agli standars ed ai campioni così preparati sono aggiunti 125 µl di reagente I, agitati su vortex, e incubati 1 minuto. Quindi vengono addizionati 125 µl di reagente II, agitati su vortex e centrifugati a 12000 g per 5 minuti. I sovrantanti sono scartati, e questo primo step è ripetuto variando i volumi di reagente I (125 µl) e II (40µl). Sono quindi addizionati 127 µl di reagente A* per ciascuna eppendorf, agitato e incubato per 5 min o finchè il precipitato non è completamente disciolto. Si addiziona infine 1 ml di reagente B in ciascuna eppendorf agitando immediatamente e si lascia in incubazione per 15 minuti. Al termine del periodo di incubazione si procede alla lettura dei campioni alla lunghezza d'onda di 750 nm.

Si costruisce una retta di taratura nell'intervallo di sensibilità da 5 µg a 37.5 µg: $y=Ax$, e dall'equazione della retta si procede al calcolo della concentrazione proteica per il campione incognito.

$$\frac{(\text{lettura campione} - \text{lettura bianco})}{\text{assorbanza}} \times \text{fattore diluizione} = \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$$

IIIId. Elettroforesi Bidimensionale

Isoelettrofocalizzazione

La prima dimensione è effettuata su strip di 18 cm in cui è presente un gradiente lineare di pH 3-10 (Amersham Biosciences).

-Il volume caricabile su una strip da 18 cm è di 350 µl.

-Il volume del campione deve essere < al 25% del volume totale.

-Al momento vengono aggiunti 0,5% di anfoliti.

Si caricano su strip holder i 350 µl del campione (pari a 150 µg di proteine); si pone sopra l'IPG strip e si copre con l'IPG Cover Fluid (Amersham Biosciences), un olio minerale che minimizza l'evaporazione e la cristallizzazione dell'urea, prima di chiudere con l'apposito coperchietto.

Per la prima dimensione è utilizzato l'Apparecchio IPGphor (Amersham Biosciences) che permette di impostare reidratazione e IEF del campione contemporaneamente (Tabella 6). Il programma utilizzato come tempi e voltaggio applicati è sotto elencato e arriva a permettere di ottenere fino ad ottenere 70000 V totali:

Tabella 6. *Ettan IPGphor Isoelectric Focusing System.*

| | | | |
|---------------|-----|-------|------|
| reidratazione | 1h | 0V | 16°C |
| I step | 10h | 30V | 16°C |
| II step | 1h | 200V | 16°C |
| III step | 30' | 300V | 16°C |
| IV step | 3h | 3500V | 16°C |
| V step | 10' | 5000V | 16°C |
| Vi step | 12h | 8000V | 16°C |

Gli alti voltaggi raggiunti richiedono un controllo della temperatura che infatti è mantenuta a 16°C per tutta la corsa. Inoltre, dopo la reidratazione delle strip, vengono inseriti sugli elettrodi dei quadratini di una apposita carta per isoelettrofocusing (electrode pads). Tali pads vengono inumiditi con acqua MilliQ e posti tra la strip e gli elettrodi per preservare questi ultimi dalla precipitazione degli ioni.

Al termine della IEF la strip viene ripulita dall'eccesso di olio minerale e utilizzata subito per la seconda dimensione o conservata a -20 °C.

Equilibratura

Prima di effettuare la seconda dimensione la strip viene equilibrata incubandola, in successione, con:

- 1) 10 ml di SDS Equilibration Buffer + DTT 1% per 15 minuti in agitazione a temperatura ambiente;
- 2) 10 ml di SDS Equilibration Buffer + IAA 2,5% per 15 minuti in agitazione a temperatura ambiente;

L' SDS equilibration buffer contiene:

Tampone equilibrante (Tris-HCl 50 mM pH 8,8): per mantenere le strip in un range di pH appropriato per l'elettroforesi;

Urea (6 M) *Glicerolo* (30%): per ridurre l'elettroendoosmosi e migliorare il trasferimento delle proteine alla seconda dimensione. L'elettroendoosmosi è dovuta alla presenza di cariche fisse sulla strip all'interno di un campo elettrico e può interferire con il trasferimento delle proteine dalla strip al gel della seconda dimensione;

Sodio dodecil solfato (2%): denatura le proteine e forma complessi proteine-SDS carichi negativamente. La quantità di SDS legato ad una proteina, e quindi la carica negativa, è direttamente proporzionale alla massa della proteina, in questo modo l'elettroforesi separerà le proteine in base al loro peso molecolare;

Blu di Bromofenolo (0,002%): usato come agente tracciante per seguire la corsa elettroforetica;

Ditiotreitolo (1%): agente riducente per preservare lo stato ridotto delle proteine;

Iodoacetammide (2,5%; al 2° lavaggio): per alchilare i gruppi tiolici delle proteine e prevenirne la riossidazione durante l'elettroforesi.

Seconda Dimensione

La strip viene posta sopra un gel di poliacrilammide 12% (20cm×20cm×1,5mm), facendo bene attenzione che aderisca in tutta la sua lunghezza al gel, e bloccata con una soluzione di agarosio 0.1% in Running Buffer.

L'elettroforesi è effettuata in due step: per i primi 15 minuti si impostano 15 mA per gel aumentando poi la corrente a 40 mA per gel finchè il fronte del campione, visualizzato tramite il Blu di bromofenolo, esce dal fondo di corsa (circa 5:30 ore).

Per la corsa elettroforetica si utilizza il RUNNING BUFFER 10X (Tris-base 25mM, Glicina 192 mM, SDS 0.1%) diluito 1:10; la diluizione viene fatta il giorno precedente per mantenere il tampone a 4°C e poterlo utilizzare freddo.

Preparazione Del Gel 12% Nel Multicasting

Al fine di minimizzare la variabilità sperimentale e quindi aumentare la riproducibilità, i gel di acrilammide (12%) vengono preparati contemporaneamente (fino ad 8 gel-Tabella 7) utilizzando l'apparecchio Multicasting della Biorad e la corsa è condotta su di un apparecchio Protean II XI Multi-cell 2D in grado di ospitare e far correre contemporaneamente fino a 6 gel in condizioni termostatate (circa 10°C).

Tabella 7. Volumi per 6 ed 8 gel di acrilammide al 12%.

| | 6 gel | 8 gel |
|---------------------------------|----------|----------|
| H ₂ O milliQ | 142.8 ml | 190.4 ml |
| Tampone Tris 1.5M pH8.8 | 105 ml | 140 ml |
| Acrilammide/bis-acrilammide 30% | 168 ml | 224 ml |
| Ammonio persolfato 10% | 2.1 ml | 2.8 ml |
| Temed | 105 µl | 140 µl |

Colorazione dei gel

I gel bidimensionali così ottenuti sono stati colorati utilizzando una colorazione all'argento/ammoniaca.

Alla fine della seconda dimensione, il gel viene rimosso dai vetri ed è lavato con acqua deionizzata per 5 min, quindi lasciato in etanolo:acido acetico:acqua (40:10:50) per un'ora, e successivamente in etanolo:acido acetico:acqua (5:5:90) per tutta la notte. All'indomani il gel viene sottoposto ad un processo multi-step:

- Viene lavato per 5 min con acqua deionizzata;
- Si lascia per 30 min in una soluzione di 1% glutaraldeide e 0,5M sodio acetato;
- Si lava 3x10 min con acqua deionizzata;
- Viene incubato 2x30 min con una soluzione di acido 2,7-naftalene disulfonico 0,05%;
- Al termine di questo periodo di incubazione il gel è nuovamente lavato 4x15 min con acqua deionizzata;
- Viene quindi colorato in una soluzione fresca di nitrato di argento 2,5% e ammoniaca 30% per 30 min;
- Dopo la colorazione, il gel è lavato con acqua deionizzata 4x4 min e sviluppato in soluzione di acido citrico 0,01% e formaldeide 0,1% per 3:40 min;
- La reazione è stoppata con una soluzione di Tris 5% e acido acetico al 2%.

Tutte gli steps della colorazione sono condotti a temperatura ambiente e sotto agitazione, inoltre i tempi di sviluppo sono mantenuti costanti per tutti i gel per poter fare confronti quantitativi oltre che qualitativi tra gel differenti.

Gel Preparativi

Per l'identificazione delle proteine d'interesse occorre estrarre queste ultime dal gel perché possano poi essere sequenziate tramite spettrometria di massa MALDI-TOF; la colorazione all'argento utilizzata non risulta però compatibile con la spettrometria di massa, pertanto occorre realizzare gel preparativi che saranno colorati con il Coomassie Colloidale; una colorazione meno sensibile di quella all'argento.

Questa procedura richiede quindi di caricare un quantitativo maggiore di proteine, nel nostro caso abbiamo caricato 1500 µg.

Prima dimensione

Per i gel preparativi si carica un volume di campione pari a 1500 µg e si arriva ad un volume finale di 400 µl con la soluzione di reidratazione. Si utilizzano sempre strip da 18 cm con un gradiente lineare di pH 3-10 e si aggiungono al momento 0,5% di anfiliti.

Cambia il programma utilizzato (Tabella 8):

Tabella 8. *Isoelettrofocusing per gel preparativi*

| | | | |
|---------------|------|-------|------|
| reidratazione | 1h | 0V | 16°C |
| I step | 12 h | 30V | 16°C |
| II step | 11h | 200V | 16°C |
| III step | 2 h | 300V | 16°C |
| IV step | 3h | 3500V | 16°C |
| V step | 3h | 3500V | 16°C |
| VI step | 15 h | 5000V | 16°C |

Seconda dimensione e colorazione

La procedura della seconda dimensione è analoga a quella utilizzata per i gel analitici ma per la colorazione si utilizza il Coomassie Brilliant Blue G-Colloidal che, a differenza della colorazione all'argento, è compatibile con la spettrometria di massa. Il *Coomassie Colloidale* contiene:

0,12% Coomassie Brilliant Blue G-250

10% Ammonio solfato

2% Acido fosforico.

Il colorante così preparato deve essere diluito al momento dell'utilizzo con il metanolo (4 parti di colorante per 1 di metanolo) agitando per 30 secondi. La colorazione prevede pochi passaggi:

- Terminata la corsa, il gel viene lasciato per un'ora, in agitazione, nella soluzione di fissaggio contenente il 7% di acido acetico ed il 40% di metanolo;
- Il gel è messo in incubazione nel colorante dalle 2 alle 12 ore;
- Si sostituisce il colorante con una soluzione di acido acetico (10%) e metanolo (25%) mantenendo il gel in agitazione, a temperatura ambiente, per 60 secondi;
- Si cambia la soluzione con un'altra di metanolo (25%), sempre agitando il gel, sostituendola dopo pochi secondi con una nuova di metanolo (25%) che può essere lasciata fino a 24 ore.

Analisi dei Gel Tramite Image Master 2D Platinum

Le immagini dei gel sono state acquisite tramite uno scanner (Epson Expression 1680) e analizzate con il programma Image Master 2D Platinum 5.0 dell'Amersham Bioscience. Tramite software si possono mettere a confronto i gel ottenuti dall'elettroforesi bidimensionale della saliva. Gli spots proteici di ciascun gel sono selezionati, numerati e confrontati (sovrapposti). I gel sono divisi nelle diverse classi in modo che il programma sia poi in grado di effettuare un confronto tra i gel all'interno della stessa classe e tra classi diverse. Il programma permette, infatti, di evidenziare eventuali variazioni nell'entità e/o nella presenza o assenza di determinate proteine. Dopo la messa in evidenza degli spot nei gel, sempre mediante software vengono generati dei gel sintetici uno per ciascuno dei gruppi di soggetti di volta in volta esaminati. Ciascuno dei gel sintetici contiene esclusivamente gli spot comuni a tutti i singoli gel del gruppo in esame ovvero solo gli spot espressi nella totalità dei gel del gruppo di soggetti in esame può entrare a far parte del gel sintetico. La finalità dei gel sintetici è stata quella di isolare un numero definito di proteine di interesse che sono state poi caratterizzate mediante spettrometria di massa. La valutazione quantitativa della densità ottica delle proteine nei diversi gruppi di soggetti in studio è, invece, stata valutata mediante il confronto delle medie dei singoli valori ottenute considerando gli spots proteici dei singoli gel di ciascun gruppo.

IIIe. MALDI-TOF

Preparazione dei campioni per MALDI-TOF

Gli spots proteici di interesse sono tagliati dal gel utilizzando per la digestione la tripsina seguendo la seguente procedura:

- i gel ottenuti mediante 2-DE vengono trattati con bicarbonato di ammonio 50mM e acetone (AcN) 30% per 30' a temperatura ambiente
- i gel vengono disidratati per 30' in una centrifuga Hetovac (HETO, Allerod, Denmark) e quindi reidratati per 45' a 4°C in 5-20 µl di una soluzione 50 mM di bicarbonato di ammonio contenente tripsina a 6.25 ng/ µl
- Dopo il periodo di incubazione di una notte, i gel vengono disidratati in centrifuga, reidratati con 20 µl di H₂O e alla fine disidratati di nuovo
- L'eluizione dei peptidi viene effettuata con 20 µl di acido trifluoroacetico (TFA) all'0.1% per 20' a temperatura ambiente
- La soluzione di TFA contenente le proteine di è trasferita in un tubo di propilene
- Una seconda eluizione dei peptidi viene effettuata con 20 µl di TFA allo 0'1% in 50% AcN per 20' a temperatura ambiente
- Le due eluizioni vengono poste insieme e il volume complessivo viene ridotto di 1-2 µl per evaporazione
- Estrazioni di controllo vengono effettuate utilizzando parti dei gel privi di proteine
- Gli spots sono così inviati al Core Facility Proteomic (Università di Ginevra) per l'analisi spettrometrica che consente di identificare le proteine.

Identificazione proteica mediante finger printing (MALDI-TOF)

Prima del finger printing, le soluzioni contenenti i peptidi vengono addizionate con TFA allo 0.1% in 50% AcN e portate ad un volume di 5 µl. Un microlitro di ciascun campione viene depositato su una piastra 2 x 96 della MALDI e portato a secco sottovuoto. Viene aggiunto un ugual volume di matrice (10 mg/ml α -cyano-4-hydroxycinnamic acid in 50% AcN, 0.1% TFA). I campioni vengono portati a secco sottovuoto nuovamente. La MS è stata condotta mediante lo spettrometro Voyager super STR (Applied Biosystems, Foster City, CA) corredato di un laser nitrogene di 337 nm. L'analisi è stata eseguita in reflectrone con un acceleratore di voltaggio di 20 kV, un parametro di ritardo di estrazione di 350 ns, e un limite basso di massa di 850 Da. Gli spettri sono stati ottenuti dalla somma di 150-300 spari laser consecutivi. I picchi di massa sono stati estratti dagli spettri e l'identificazione proteica è stata effettuata utilizzando il MASCOT 2.1 peptide mass

fingerprint tool e il motore di ricerca ProFound del PROWL (<http://prwl.rockefeller.edu>). Come databases sono stati utilizzati il SWISS_PROT e il TrEMBL utilizzando come limiti per la ricerca i seguenti: specie umana, tolleranza della massa ± 50 ppm, clivaggio perso con la tripsina fino a 1 e modificazioni della cisterna per carbamidometilazione.

III f. Analisi Statistica

I valori di densità ottica delle proteine di interesse sono stati espressi come % di volume. L'analisi statistica di comparazione tra i livelli di espressione delle singole proteine nella saliva dei pazienti arruolati è stata effettuata mediante test ANOVA per il confronto delle medie tra più gruppi analizzati simultaneamente e mediante *t*-test per il confronto delle medie dei gruppi a due a due. Un p-value <0.05 è stato considerato statisticamente significativo.

IV. RISULTATI

IVa. ANALISI DEI GEL SINTETICI

Le figure allegate rappresentano rispettivamente le immagini dei gel sintetici e dei gel rappresentativi ottenuti dalla saliva dei soggetti sani e dei pazienti con SjS, Sclerodermia, sindrome secca, e profilo autoanticorpale patologico: anti-SSA e anti-SSA + anti-SSB positivi. (Fig 6-17 vedi allegati)

Il confronto della percentuale di volume degli spot presenti nei gel sintetici dei gruppi in esame, considerati a due a due, ha evidenziato differenze statisticamente significative nell'espressione qualitativa e quantitativa di numerose proteine salivari.

In particolare, comparando il gel sintetico ottenuto dal gruppo di pazienti affetti da SjS con quello dei controlli, è stato possibile identificare 10 spots presenti solo nel gel sintetico patologico e 4 spots presenti solo in quello dei controlli. Nell'ambito dei 10 spots è stata evidenziata la presenza di diverse proteine con pI tra 5,0 e 6,5 e PM intorno a 30-45 Kda, come il precursore della Zn- α_2 -glicoproteina (spot n° 33)*, anche se l'analisi di massa non è stata in grado di identificare la totalità degli spots (spots n°48, 46, 30, 34). E' inoltre stato possibile documentare la presenza di numerose proteine coinvolte nei processi flogistici come: la calgranulina B, la lipocalina e la fosfatidiletanolamina binding protein, nonché, spots (n°47) relativi all'espressione della catena leggera κ delle immunoglobuline. Nell'ambito degli spots presenti solo nel gel sintetico dei controlli è invece da sottolineare quello (spot n° 29) relativo alla carbonato anidrasi VI e alle cistatine e ai loro precursori (cistatina D, C, S) (spots n° 5,7,12). La tabella 9 riassume le principali differenze qualitative che lo studio ha permesso di evidenziare. La tabella 10 mostra, invece, le differenze quantitative relative alle proteine la cui espressione differisce di almeno due volte nei due gruppi. L'analisi dei gel, infatti, ha mostrato 14 spots caratterizzati da una diversa intensità tra pazienti e controlli: 10 spots mostravano un costante incremento (spots n°10, 35, 36, 32, 17, 2, 4, 18, 19, 21) nei malati rispetto ai controlli mentre 4 risultavano significativamente meno intensi (spots n°40, 9, 23, 16) nei pazienti con SjS (102,103).

**I numeri degli spots si riferiscono ai gel rappresentativi*

Tabella 9. Proteine presenti esclusivamente nel gel sintetico dei pazienti con Sjs o nei soggetti sani

| Spot No | Protein | Swiss-Prot accession no | Mr (x10 ³) | pI | sequence coverage% | Matched peptides |
|-----------------------|--|-------------------------|------------------------|------|--------------------|------------------|
| Controlli sani | | | | | | |
| 5 | Cystatin D | P28325 | 16.1 | 7.63 | 31 | 5 |
| 7 | Cystatin C precursor | P01034 | 16 | 9.00 | 49 | 14 |
| 12 | Cystatin S precursor | P01036 | 16.4 | 4.95 | 68 | 12 |
| 29 | Carbonic anhydrase VI | Q5FC00 | 35.4 | 8.43 | 24 | 9 |
| Sjs | | | | | | |
| 41 | Calgranulin B | P06702 | 13.2 | 5.71 | 76 | 9 |
| 42 | Cyclophilin A | P62937 | 18 | 7.82 | 85 | 17 |
| 43 | Lipocalin-1 precursor | P31025 | 19.4 | 5.39 | 31 | 4 |
| 45 | Phosphatidyl ethanolamine binding protein (PEBP) | P30086 | 21 | 7.42 | 92 | 20 |
| 47 | IGKC protein | Q6GMW1 | 26 | 7.55 | 41 | 8 |
| 33 | Zinc- α_2 -glycoprotein precursor | P25311 | 34 | 5.57 | 23 | 11 |

Tabella 10. *Proteine espresso con diversa concentrazione nei gel sintetici dei SjS e dei controlli sani*

| Spot No | Protein name | Swiss-Prot accession no. | Mr(x10 ³) | | pI | | sequence coverage % | Matched peptides | Score |
|---------|--|--------------------------|-----------------------|--------|-------|--------|---------------------|------------------|-------|
| | | | Theor | Observ | Theor | Observ | | | |
| 10 | fatty acid-binding protein(E-FABP) | Q01469 | 15.3 | 12.0 | 6.84 | 6.48 | 68 | 17 | 108 |
| 35 | ACTB protein (actin) | Q96E67 | 40.5 | 40.1 | 5.55 | 5.24 | 57 | 21 | 114 |
| 36 | β-actin fragment | Q96HG5 | 41.3 | 41.0 | 5.56 | 5.04 | 23 | 8 | 50 |
| 32 | leukocyte elastase inhibitor | P30740 | 42.8 | 40.7 | 5.90 | 6.08 | 23 | 8 | 43 |
| 17 | glutathione-S-transferase | P09211 | 23.4 | 23.4 | 5.44 | 5.56 | 32 | 6 | 48 |
| 40 | α-amylase precursor | P04745 | 58.4 | 54.9 | 6.47 | 6.40 | 62 | 31 | 177 |
| 9 | cystatin SN precursor | P01037 | 16.5 | 12.0 | 6.82 | 7.52 | 69 | 10 | 105 |
| 23 | keratin 6-L | Q5XKE5 | 58 | 33.1 | 6.75 | 4.52 | 14 | 7 | 37 |
| 16 | prolactin-inducible protein precursor(PIP) | P12273 | 16.8 | 14.8 | 8.26 | 4.64 | 69 | 10 | 105 |
| 18 | not identified | -- | nd | 23.4 | nd | 5.20 | -- | -- | -- |
| 19 | not identified | -- | nd | 23.9 | nd | 5.00 | -- | -- | -- |
| 21 | not identified | -- | nd | 24.5 | nd | 7.32 | -- | -- | -- |
| 4 | not identified | -- | nd | 11.8 | nd | 5.60 | -- | -- | -- |
| 2 | not identified | -- | nd | 42.8 | nd | 6.36 | -- | -- | -- |

Il confronto tra il gel sintetico dei pazienti con Sclerodermia e dei controlli sani ha, invece, messo in luce 20 spots che sono risultati presenti solo nelle immagini bidimensionali dei soggetti con Sclerodermia ed assenti nei controlli. Con la spettrometria di massa è stato possibile identificare 13 di tali 20 spots che sono risultati confluire in 9 proteine identificate come: ciclofillina A (spot n°42), calgranulina B (spots n°41, 52, 53, 54), psoriasina (spot n°55), beta-2-microglobulina (spot n°56), calgranulina A (spot n°57, 58), gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (spot n°64), TPI (spot n°65), complesso Arp2/3 (spot n°67) e cistatina B (spot n°59). La tabella 11 riassume questi risultati.

Nel confronto tra gel sintetico dei pazienti con Sclerodermia e SjS gli spots relativi a psoriasina (spot n°55), calgranulina A (spot n°57, 58), gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (spot n°64), TPI (spot n°65), complesso Arp2/3 (spot n°67) e cistatina B (spot n°59) e carbonato anidrasi VI (spot n°26-29) risultavano presenti solo nel gel sintetico dei pazienti con sclerodermia. Non risultavano, invece, identificabili nel gel sintetico dei pazienti con Sclerodermia gli spot relativi alla E-FABP e alla lipocalina . Ulteriori differenze tra gel sintetici dei pazienti con SjS e Sclerodermia emergevano nell'espressione delle cistatine e dei loro precursori, dell' α -amilasi salivare, della cheratina 6L, della PIP, della glutatione-S-transferasi e dell'inibitore dell'elastasi leucocitaria.

Tabella 11. Spot proteici identificati solo nel gel sintetico dei pazienti con Sclerodermia e non nei controlli

| Spot No | Protein | Swiss-Prot accession no | Mr (x10 ³) | pI | sequence coverage% | Matched peptides |
|---------|---|-------------------------|------------------------|------|--------------------|------------------|
| 41 | Calgranulin B | P06702 | 13.2 | 5.71 | 76 | 9 |
| 52 | Calgranulin B | P06702 | 13.2 | 5.71 | 53 | 5 |
| 54 | Calgranulin B | P06702 | 13.2 | 5.71 | 70 | 7 |
| 53 | Calgranulin B** | P06702 | 13.2 | 5.71 | 55 | 7 |
| 55 | Psoriasis | P31151 | 11.4 | 6.26 | 49 | 7 |
| 56 | β2-microglobulin | Q6IAT8 | 13.8 | 6.06 | 37 | 4 |
| 57 | Calgranulin A | P05109 | 10.8 | 6.51 | 62 | 8 |
| 58 | Calgranulin A | P05109 | 10.8 | 6.51 | 63 | 11 |
| 59 | Cystatin B | P04080 | 11.1 | 6.96 | 64 | 6 |
| 42 | Cyclophilin A | P62937 | 18 | 7.82 | 54 | 11 |
| 64 | Glyceraldeyde-3-**-phosphate dehydrogenase | P04406 | 35.9 | 8.58 | 23 | 5 |
| 65 | Triose phosphate isomerase | P60174 | 26.8 | 6.51 | 62 | 15 |
| 67 | Actin-related protein 2/3 complex subunit 2 | O15144 | 34.4 | 6.84 | 43 | 18 |

I risultati del confronto dei rimanenti gel sintetici sono riassunti nella Tabella 12

Tabella 12: Gel sintetici a confronto

| | | | | | | |
|------------|----------------------------------|---------|------|-----------------------|-----|-------------------|
| vs | Sindrome secca idiopatica | | | | | |
| SjS | lipocalina | amilasi | PEPB | Carbonato anidrasi VI | PIP | Cistatina B, D, S |

| | | | | | | |
|------------|--------------------|---------|-----------------------|-----|-------------------|--|
| vs | Anti-Ro/SSA | | | | | |
| SjS | lipocalina | amilasi | Carbonato anidrasi VI | PIP | Cistatina B, D, S | |

| | | | | | | |
|------------|----------------------------------|---------------------------------|--|--|-----|-------------|
| vs | Sindrome secca idiopatica | | | | | |
| SjS | lipocalina | Inibitore elastasi leucocitaria | | | PIP | Cistatina D |

| | | | | | | |
|---------------------|----------------------------------|-------------|----------------|--------------|-----|----------------|
| vs | Sindrome secca idiopatica | | | | | |
| Sclerodermia | Cistatina B | Cistatina S | Calgranulina B | Cistatina SN | PIP | Ciclofillina A |

| | | | | | | |
|---------------------|--------------------|-------------|----------------|--------------|--------|---------------------------|
| vs | Anti-Ro/SSA | | | | | |
| Sclerodermia | Cistatina B | Cistatina D | Calgranulina B | Cistatina SN | actina | β -2 microglobulina |

| | | | | | | |
|---------------------|----------------------------------|--|---------|--------------|--|--|
| vs | Anti-Ro/SSA + Anti-La/SSB | | | | | |
| Sclerodermia | Cistatina B | | amilasi | Cistatina SN | | |

| | | | | | | |
|--------------------|----------------------------------|--|----------------------|--|----------------------|--|
| vs | Anti-Ro/SSA + Anti-La/SSB | | | | | |
| Anti-Ro/SSA | β -2 microglobulina | | Spot n° 68 (non id.) | | Spot n° 80 (non id.) | |

| | | | | | | |
|--------------------|----------------------------------|--|-------------|----------------|-----|--|
| vs | Sindrome secca idiopatica | | | | | |
| Anti-Ro/SSA | Calgranulina B | | Cistatina S | Calgranulina A | PIP | |

| | | | | | | |
|----------------------------------|----------------------------------|----------------------|----------------|---------------------|--|--|
| vs | Sindrome secca idiopatica | | | | | |
| Anti-Ro/SSA + Anti-La/SSB | amilasi | Spot n° 91 (non id.) | Calgranulina B | Spot n° 5 (non id.) | | |

L'analisi dei gel sintetici data l'alta stringenza dei gel stessi (100%) non permette di valutare in maniera effettiva variazioni qualitative o quantitative nell'espressione delle proteine dal momento

che sono automaticamente esclusi dal sintetico gli spot non condivisi da tutti i singoli gel di ciascun gruppo. Tuttavia essa ha consentito di restringere il campo d'analisi a 15 proteine la cui espressione sembra variare in maniera significativa nei gruppi.

IVb. ANALISI QUANTITATIVA DELLE PROTEINE DI INTERESSE

I dati preliminari hanno consentito di identificare 15 proteine espresse in maniera diversa nei gruppi in esame. Tali proteine sono elencate in Tabella 13 insieme all'analisi quantitativa della percentuale di volume ad esse relativa che è stata condotta misurando le singole percentuali di volume di ciascuno spot di interesse su ciascuno dei gel analitici di ogni gruppo e calcolandone media e deviazione standard.

Tabella 13. Media e deviazione standard della densità ottica delle proteine

| | Controllo sano | | SjS | | Sindrome secca | | Sclerodermia | | SSA | | SSA/SSB | |
|--------------------------|----------------|----------|----------|----------|----------------|----------|--------------|----------|---------|----------|---------|----------|
| | media | DS | media | DS | media | DS | media | DS | media | DS | media | DS |
| amilasi | 2.758571 | 1.049070 | 0.793333 | 0.434885 | 1.412000 | 0.598000 | 3.618000 | 3.120203 | 3.1067 | 2.301127 | 0.9500 | 0.532000 |
| PIP | 9.027143 | 3.641473 | 3.050000 | 2.033273 | 2.060000 | 2.738786 | 5.354000 | 1.742708 | 4.8433 | 1.836264 | 3.5680 | 3.801200 |
| albumina | 2.654286 | 0.627876 | 2.293000 | 2.016339 | 1.727500 | 0.991543 | 3.294000 | 1.229789 | 2.9140 | 1.200637 | 1.4260 | 0.800768 |
| cheratina 6L | 1.844000 | 0.510911 | 0.290000 | 0.485489 | 0.101000 | 0.174937 | 4.910000 | 1.307918 | 2.0325 | 1.607407 | 1.4125 | 1.984698 |
| actina | 0.661000 | 0.250000 | 1.340000 | 0.340000 | 1.236667 | 0.615911 | 0.690909 | 0.309207 | 0.99200 | 0.392173 | 0.9500 | 0.532466 |
| carbonato VI | 3.395714 | 1.375753 | 0.414000 | 0.625392 | 0.690000 | 0.283196 | 0.816000 | 0.578299 | 2.6025 | 2.244777 | 0.2260 | 0.311897 |
| cistatina SN | 4.764615 | 1.882947 | 1.419615 | 0.735749 | 0.967500 | 0.781340 | 6.127833 | 4.283895 | 2.3467 | 0.615169 | 3.4975 | 3.242452 |
| cistatina S | 2.086000 | 0.480240 | 0.735714 | 0.548266 | 0.462250 | 0.221447 | 1.501667 | 0.471950 | 1.2000 | 0.420535 | 0.3375 | 0.430842 |
| cistatina D | 0.734000 | 0.698000 | 0.527273 | 0.621741 | 0.517500 | 0.531311 | 1.640000 | 0.669925 | 0.7520 | 0.353935 | 1.1575 | 0.526712 |
| Imb. Elastasi leuc | 0.170000 | 0.020000 | 0.540000 | 0.110000 | 0.280000 | 0.226936 | 0.218333 | 0.094110 | 0.2470 | 0.40106 | 0.2840 | 0.240217 |
| lipocalina | 0.020000 | 0.056569 | 0.165000 | 0.110454 | 0.031667 | 0.077567 | nd | | nd | | nd | |
| ciclofillina A | nd | | 0.358000 | 0.110454 | 0.260000 | 0.109087 | 0.262857 | 0.089762 | 0.2467 | 0.064291 | 0.1800 | 0.17356 |
| calgranulina B | 0.091667 | 0.142887 | 2.442000 | 1.353706 | 1.890000 | 0.470957 | 3.302857 | 1.353067 | 1.7317 | 0.853379 | 2.6525 | 1.654476 |
| β 2 microglobulina | 0.580000 | 0.370135 | 1.793000 | 0.624000 | 0.887000 | 0.299070 | 1.112500 | 0.615090 | 0.5133 | 0.166693 | 1.08800 | 0.574000 |
| IgKc | 0.272000 | 0.177398 | 0.760000 | 0.214243 | 0.570000 | 0.203000 | 0.243333 | 0.230275 | 0.3645 | 0.194491 | 0.4400 | 0.229637 |

Il confronto delle medie della densità ottica nei gruppi è stato effettuato mediante test ANOVA e i risultati ottenuti sono riassunti in tabella 14.

Tabella 14. Test ANOVA per il confronto delle medie della densità ottica tra i gruppi

| | ANOVA su tutti i gruppi | Espressione nello SjS |
|---------------------------------|----------------------------|-----------------------|
| albumina | p=0,28 | invariata |
| amilasi | p=0,013 | ridotta |
| PIP | p=0.001 | ridotta |
| cheratina 6L | p=0,004 | ridotta |
| carbonato VI | p<0.0001 | ridotta |
| actina | p=0.001 | aumentata |
| cistatina SN | p<0.0001 | ridotta |
| cistatina S | p<0,0001 | ridotta |
| cistatina D | p=0,018 | ridotta |
| Inibitore elastasi leucocitaria | p<0,0001 | aumentato |
| lipocalina | p=0,003 | aumentata |
| ciclofillina A | p=? | aumentata |
| calgranulina B | p=0,001 | aumentata |
| β -2 microglobulina | p=0,0007 | aumentata |
| IgKc | p=0.0013 | aumentata |

Per chiarire il significato delle differenze osservate con il test ANOVA il confronto delle medie della densità ottica dei diversi spot rispetto alla SjS è stato effettuato mediante t-test di Student ed i risultati ottenuti sono riassunti in tabella 15.

Tabella 15. Risultati t-test confronto SjS verso controlli sani e patologici

| p- value (SjS vs..) | sano | sicca | sclero | SSA | SSA/SSB |
|---------------------------|-------------------|--------------|-------------------|---------------|-------------|
| albumina | 0,65 | 0,60 | 0,33 | 0,54 | 0,37 |
| amilasi | 0,0002 | 0,06 | 0,01 | 0,01 | 0,82 |
| PIP | 0,0009 | 0,45 | 0,05 | 0,10 | 0,74 |
| cheratina 6L | 0,0011 | 0,40 | <0,0001 | 0,06 | 0,25 |
| carbonato VI | <0,0001 | 0,42 | 0,25 | 0,01 | 0,54 |
| actina | <0,0001 | 0,69 | 0,0027 | 0,01 | 0,01 |
| cistatina SN | <0,0001 | 0,30 | 0,001 | 0,06 | 0,03 |
| cistatina S | 0,0013 | 0,37 | 0,02 | 0,14 | 0,24 |
| cistatina D | 0,51 | 0,97 | 0,003 | 0,46 | 0,09 |
| Inib. Elastasi leuc | 0,0001 | 0,007 | 0,0001 | 0,03 | 0,01 |
| lipocalina | 0,0056 | 0,02 | nd | nd | nd |
| ciclofillina A | nd | 0,20 | 0,137 | 0,18 | 0,07 |
| calgranulina B | 0,002 | 0,46 | 0,30 | 0,31 | 0,83 |
| β -2 microglobulina | 0,0025 | 0,023 | 0,045 | 0,0004 | 0,06 |
| IgKc | 0,0019 | 0,15 | 0,0015 | 0,005 | 0,04 |

La tabella 16 illustra, infine, i risultati del confronto tra i vari gruppi e i controlli sani.

Tabella 16. Risultati di confronto dei gruppi patologici verso il gruppo di controllo dei soggetti sani ricavati con il t-test di Student

| p- value (sano vs..) | SjS | sicca | sclero | SSA | SSA/SSB |
|---------------------------|-------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| albumina | 0,65 | 0,08 | 0,26 | 0,63 | 0,06 |
| amilasi | 0,0002 | 0,03 | 0,50 | 0,72 | 0,05 |
| PIP | 0,0009 | 0,0049 | 0,06 | 0,03 | 0,01 |
| cheratina 6L | 0,0011 | 0,0014 | 0,001 | 0,33 | 0,42 |
| carbonato VI | <0,0001 | 0,0042 | 0,003 | 0,47 | 0,0005 |
| actina | <0,0001 | 0,023 | 0,8 | 0,06 | 0,18 |
| cistatina SN | <0,0001 | 0,0015 | 0,34 | 0,06 | 0,33 |
| cistatina S | 0,0013 | 0,0004 | 0,07 | 0,01 | 0,0008 |
| cistatina D | 0,51 | 0,59 | 0,03 | 0,95 | 0,31 |
| Inib. Elastasi leuc | 0,0001 | 0,11 | 0,11 | 0,11 | 0,12 |
| lipocalina | 0,0056 | 0,7 | nd | nd | nd |
| calgranulina B | 0,002 | 0,0001 | 0,0001 | 0,0009 | 0,005 |
| β -2 microglobulina | 0,002 | 0,22 | 0,11 | 0,69 | 0,13 |
| IgKc | 0,0019 | 0,03 | 0,82 | 0,43 | 0,25 |

V. DISCUSSIONE

I risultati ottenuti hanno permesso di mettere in evidenza numerose differenze tra il pattern proteico salivare dei pazienti con SjS ed i profili proteici salivari dei soggetti sani e dei controlli patologici.

In particolare nello studio sono state valutate le differenze relative all'espressione delle seguenti proteine salivari:

- proteine salivari acinari (albumina, α -amilasi salivare, PIP, cheratina 6L, anidrase carbonica VI).
- proteine infiammatorie e legate all'autoimmunità (calgranulina B, ciclofillina A, catena leggera κ delle immunoglobuline, beta2-microglobulina)
- proteine coinvolte nell'equilibrio proteasi / antiproteasi (cistatine D, S, SN e loro precursori, inibitore dell'elastasi leucocitaria)
- proteine coinvolte nel danno tissutale (actina, lipocalina-1 precursore)

Il profilo di espressione delle proteine salivari prodotte a livello acinare appare modificato nei pazienti con SjS rispetto ai controlli sani con una riduzione dell'intensità ottica dello spot principale dell'albumina e degli spot dell' α -amilasi salivare, della PIP, della cheratina 6L e della carbonato anidrase VI. E' possibile osservare una riduzione dell'espressione delle suddette proteine acinari (seppure ai limiti della significatività statistica) anche nei profili proteici salivari dei controlli patologici, secondo un gradiente che avvicina i pazienti con SjS a quelli con sindrome sicca idiopatica e ai soggetti asintomatici con anticorpi anti-RoSSA/+ anti-La/SSB e, viceversa, i controlli sani ai soggetti affetti da sclerodermia e ai portatori asintomatici di anti-Ro/SSA. I dati ottenuti sono in linea con gli studi della letteratura che documentano nella saliva dei pazienti con SjS una riduzione dell' α -amilasi salivare e della carbonato deidrogenasi VI (81). Le ipotesi proposte per giustificare la ridotta espressione delle proteine suddette sono fondamentalmente quelle della frammentazione proteica aumentata e quella di una ridotta produzione da danno acinare. La prima ipotesi può giustificare in maniera relativamente lineare la riduzione dello spot principale dell'albumina nei pazienti con SjS: quando esso viene sommato ai frammenti di albumina identificati alla spettrometria di massa, la densità degli spot totali dell'albumina non risulta statisticamente differente nel confronto tra i pazienti con SjS e tutti gli altri gruppi in studio. Anche la riduzione della PIP potrebbe essere correlata sia ad una ridotta

produzione che allo stato di infiammazione subclinica cronica del cavo orale dal momento che nel confronto con i controlli sani essa si riduce in particolare nei soggetti con SjS e con sindrome secca. La PIP è, infatti, una proteina di secrezione presente nella saliva in forma glicosilata e non glicosilata la cui funzione seppure in larga parte ancora da chiarire, sembra essere quella di legarsi ad altre proteine come il fibrinogeno, l'actina, la cheratina, la miosina e la tropomiosina. La PIP si lega anche all'idrossiapatite, componente principale della pellicola dei denti e sembra capace di legarsi ai batteri del cavo orale svolgendo un ruolo potenziale nell'immunità innata e nella difesa delle mucose (104). La riduzione della PIP che è stata evidenziata potrebbe, pertanto, essere analoga a quella della PIP lacrimale descritta nei pazienti con blefarite cronica. Altre due proteine ricche in prolina, che si riducono nei controlli patologici sono l' α -amilasi salivare e la carbonato deidrogenasi VI, la prima è un'idrolasi coinvolta nella digestione buccale dell'amido, la seconda nell'idratazione reversibile del diossido di carbonio e, di conseguenza, nel mantenimento dell'omeostasi del pH salivare. La riduzione della carbonato deidrogenasi è probabilmente la più eclatante al punto che gli spots (es.n° 26-29) che l'identificano sono addirittura mancanti nel gel sintetico dei soggetti con SjS. Il risultato può giustificare anche la tendenza del pH salivare dei pazienti con SjS ad essere complessivamente più basso (pH 6.75 ± 0.41) che nei controlli sani (pH 7.00 ± 0.48). Nel dettaglio nei gel dei soggetti sani è stato possibile identificare tre diversi spots per la carbonato deidrogenasi VI, probabilmente correlabili a isoforme dell'enzima, mentre nei singoli gel dei pazienti con SjS è stato possibile documentarne o una marcata riduzione o addirittura la non espressione. Questo dato è in linea con quanto recentemente pubblicato in letteratura in cui è stata documentata una riduzione dell'espressione del gene della carbonato deidratasi VI nelle ghiandole salivari minori dei pazienti con SjS (105). Una riduzione della carbonato deidrogenasi VI è in realtà evidenziabile anche nei soggetti con sindrome secca, con sclerodermia e nei portatori asintomatici di anti-Ro/SSA+ anti-La/SSB, mentre i valori di densità dei portatori degli anti-Ro/SSA sono sovrapponibili ai controlli sani. Infine, sempre nell'ambito dell'espressione delle proteine acinari, lo studio ha permesso di documentare una riduzione nell'espressione della cheratina 6L nei soggetti con SjS e sindrome secca ed uno spiccato aumento della stessa nei pazienti con Sclerodermia ($p < 0,0001$), verosimilmente in relazione al processo fibrotico che caratterizza la malattia. Complessivamente, con l'eccezione della cheratina, relativamente all'espressione delle proteine acinari si conferma quindi lo spettro di riduzione che ha ai due estremi i gel dei pazienti con SjS e i controlli sani. I soggetti con sindrome secca idiopatica e quelli con

anticorpi anti-Ro/SSA+ anti-La/SSB sono più simili ai pazienti con SjS, i pazienti con sclerodermia e quelli con anti-Ro/SSA ai controlli sani.

Accanto alle modificazioni nei livelli di espressione delle proteine salivari tipiche, il pattern proteico salivare dei pazienti con SjS presenta una combinazione di proteine pro-infiammatorie e legate al sistema immunitario. In realtà, proteine infiammatorie come la calgranulina B e la ciclofillina A, sono espresse in maniera aumentata, e non significativamente diversa che nello SjS, anche nei profili salivari dei pazienti con sindrome secca, sclerodermia e autoanticorpi anti-Ro/SSA e anti-Ro/SSA + anti La/SSB. assumendo quindi un significato aspecifico. La ciclofillina A è il prototipo di una famiglia di proteine altamente conservate, coinvolte in molti processi biologici come l'espressione, l'assemblamento e la degradazione delle proteine. Nell'ambito dei processi di flogosi la ciclofillina A sembra agire con meccanismo autocrino e paracrino, come attivatore delle cellule endoteliali contribuendo all'attivazione immuno-mediata e alla disfunzione endoteliale. La calgranulina B, invece, appartiene alla famiglia S100 delle proteine leganti il calcio ed è noto che viene espressa sia nei processi di flogosi acuta che nei processi di flogosi cronica. A differenza della calgranulina B e della ciclofillina A, i pazienti con SjS presentano un aumento statisticamente significativo, rispetto agli altri gruppi di pazienti, della beta-2 microglobulina e dell'espressione della catena leggera κ delle immunoglobuline. Questo risultato, può riflettere l'attivazione policlonale, sistemica e salivare, dei linfociti B nella sindrome di SjS e conferma, anche in questo caso, precedenti osservazioni della letteratura (40, 81).

Un ulteriore elemento peculiare del pattern salivare dei pazienti con SjS presente solo nei soggetti con sindrome secca idiopatica e non nei controlli sani nè nei pazienti con sclerodermia anti-Ro/SSA e anti-Ro/SSA + anti-La/SSB, concerne l'alterazione del bilancio tra proteasi e anti-proteasi salivari. Il dato più rilevante è a carico delle cistatine, S e SN. Le cistatine sono proteine inibitrici delle cistein-proteinasi che svolgono il ruolo di proteggere i tessuti da un'attivazione di sregolata delle proteinasi stesse. Le cistatine sono espresse in una ampia varietà di isoforme che possono differenziarsi per il grado di fosforilazione e/o glicosilazione. Nello studio la loro marcata riduzione può riflettere un consumo da parte delle proteasi considerando la variazione consensuale nella SjS e nelle sindromi sicche idiopatiche della cistatina SN e della S. La cistatina D non sembra presentare modificazioni significative nei pazienti con SJS rispetto ai controlli sani e agli altri gruppi patologici, con l'eccezione della Sclerodermia nella quale i livelli di cistatina D sembrano essere aumentati. Nell'ambito delle alterazioni presentate dal sistema degli

inibitori delle proteasi si osserva, inoltre, in modo peculiare nei pazienti con SjS, un aumento nei livelli di espressione di altre proteine inibitrici di proteasi salivari come la proteina inibitrice dell'elastasi leucocitaria. Questa proteina appartiene alla famiglia delle proteine inibitrici delle serin-proteasi e regola in primis l'attività delle proteasi dei neutrofili /elastasi, catepsina G e proteinasi 3. Il significato ultimo dello squilibrio osservato e la preponderante espressione delle proteine inibitrici le serin-proteasi sulle cistein-proteasi rimane in larga parte da chiarire.

Infine, in generale, nella saliva dei pazienti con SjS si osserva un'ampia espressione di proteine coinvolte nel danno tissutale sia come effettori del danno che come fattori di protezione nei confronti del danno tissutale stesso. Tra esse è stato possibile osservare, nello studio, l'aumento dell'actina e della lipocalina-1. L'actina aumenta in maniera statisticamente significativa nei pazienti con SjS e con sindrome sicca idiopatica mentre la lipocalina-1 solo nei pazienti con SjS. L'actina è una proteina del citoscheletro contenuta in tutti gli elementi cellulari. Un aumento della concentrazione salivare dell'actina è descritto anche nei pazienti con mucositi correlate a radioterapia per neoplasie del cavo orale ed è quindi considerato come marker aspecifico di danno del cavo orale. La lipocalina-1 è, invece, una proteina che agisce come scavenger fisiologico delle molecole che derivano dalla per ossidazione lipidica ma anche come inibitore delle serin-proteasi. Il suo aumento significativo nella saliva dei pazienti con SjS rimane ancora da chiarire ed appare particolarmente interessante considerando che recentemente la lipocalina-1 è stata identificata come potenziale autoantigene nelle lacrime dei pazienti affetti da SjS (106).

VI. CONCLUSIONI

Questo studio ha permesso di caratterizzare mediante analisi proteomica il profilo proteico della saliva dei pazienti con SjS confrontando il pattern ottenuto non solo con quello dei controlli sani ma anche rispetto ai diversi pattern di un gruppo eterogeneo di controlli patologici: pazienti con flogosi cronica del cavo orale ad eziologia non immune, pazienti con malattia autoimmune sistemica e pazienti con profilo autoanticorpale patologico analogo a quello dei pazienti con sindrome di Sjogren ma asintomatici per quanto relativo alla secchezza orale e oculare. I risultati ottenuti, seppure preliminari, hanno mostrato come il profilo proteico salivare dei pazienti con SjS risulti estremamente complesso e presenti aspetti peculiari che in parte riflettono l'impegno flogistico selettivo da parte della malattia delle ghiandole salivari, in parte riflettono le alterazioni del microambiente orale che essa induce e in parte, infine, la natura autoimmune sistemica della SjS. L'analisi a confronto delle modificazioni subite dal pattern proteico salivare normale, nella SjS e nelle altre diverse situazioni patologiche, ha permesso di focalizzare l'attenzione, in particolare, su 15 proteine (albumina, amilasi, proteina inducibile la prolattina, cheratina 6 L, carbonato deidrogenasi VI, cistatina SN, S, D, inibitore dell'elastasi leucocitaria, actina, lipocalina, ciclofillana A, calgranulina B, beta-2-microglobulina e catena leggera kappa delle Ig) e di speculare sull'eziopatogenesi delle modificazioni osservate.

Complessivamente nella SjS si osserva una marcata riduzione delle proteine a secrezione acinare (albumina, amilasi, proteina inducibile la prolattina, cheratina 6 L, carbonato deidrogenasi VI), una riduzione delle cistatine ed un incremento delle proteine inibitrici delle serin proteasi, un aumento delle proteine infiammatorie e delle proteine legate al danno tissutale (actina) ma soprattutto, in maniera specifica, un incremento nell'espressione della beta-2-microglobulina e della catena leggera kappa delle immunoglobuline, riconducibili all'attivazione B cellulare a livello ghiandolare ed un incremento della lipocalina, proteina scavenger, sospettata di svolgere ruolo di autoantigene a livello lacrimale. L'insieme delle alterazioni osservate suggerisce che il dosaggio dei livelli salivari di un numero limitato di proteine, identificate tramite analisi proteomica, possa costituire un valido ausilio nella diagnosi di malattia, configurando una sorta di algoritmo proteico da applicare soprattutto nei casi che rimangono dubbi nelle indagini di diagnostica tradizionale. In conclusione, quindi, seppure a livello preliminare, lo studio ha mostrato come l'analisi proteomica di fluidi biologici, scarsamente complessi

e facilmente reperibili come la saliva, possa rappresentare un'arma utile ed efficace nella diagnosi delle malattie reumatiche, in generale, e della SjS in particolare.

VII. BIBLIOGRAFIA

1. Ramos-Casals M., Tzioufas AG., Font J. Primary Sjogren's syndrome: new clinical and therapeutic concepts. *Ann Rheum Dis* 2005; 64: 347-354
2. Fox RJ. Sjogren's Syndrome. *Lancet* 2005; 366:321-331
3. Thomas E., Hay EM., Hajeer A., Silman AJ. Sjogren's syndrome: a community-based study of prevalence and impact. *Br J Rheumatol* 1998; 37: 1069-1076
4. Pillemer SR., Matteson EL., Jacobsson LT. Incidence of Physician-diagnosed primary Sjogren's syndrome in residents of Olmsted County, Minnesota. *Mayo Clin Proc* 2001; 76; 593-99
5. Bowman SJ., Ibrahim GH., Holmes G., Hamburger J., Ainsworth JR. Estimating the prevalence among Caucasian women of primary Sjogren's syndrome in two general practises in Birmingham, UK. *Scand J Rheumatol* 2004; 33:39-43
6. Trontzas PI., Andrianakos AA. Sjogren's syndrome: a population based study of prevalence in Greece. The ESORDIG study. *Ann Rheum Dis* 2005; 64: 1240-1241
7. Vitali C., Bombardieri S., Jonsson R., Moutsopoulos HM., Alexander EL, Carson SE., et al. Classification Criteria for Sjogren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. *Ann Rheum Dis* 2002; 61:554-8
8. Theander E., Manthorpe R., Jacobsson THL. Mortality and causes of death in primary Sjogren's syndrome. A Prospective cohort study. *Arthritis Rheum* 2004; 50:1262-1269
9. Arnett F. Histocompatibility typing in the rheumatic diseases: diagnostic and prognostic implications. *Med Clin North Am* 1994; 20: 371-87
10. Delaleu N, Jonsson R., Koller MM. Sjogren's syndrome. *Eur J Oral Sci* 2005; 113:101-113
11. Triantafyllopoulou A., Moutsopoulos HM. Autoimmunity and Coxsackievirus Infection in Primary Sjögren's Syndrome. *Ann N.Y. Acad Sci* 2005; 1050: 389–396
12. Skopouli FN., Moutsopoulos HM. Autoimmune epithelitis : Sjogren's syndrome. *Clin Exp Rheumatol*1994 ; 12(S11): 9-11
13. Mitsias DI, Tzioufas AG, Veiopoulou C, et al.: The Th1/Th2 cytokine balance changes with the progress of the immunopathological lesion of Sjögren's syndrome. *Clin Exp Immunol* 2002, 128:562–568.
14. Ogawa N., Ping L., Zhenjun L., Takada Y., Sugai S. Involvement of the interferon-gamma-induced T cell-attracting chemokines, interferon-gamma-inducible 10-kd protein

- (CXCL10) and monokine induced by interferon-gamma (CXCL9), in the salivary gland lesions of patients with Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 2002; 46:2730-41
15. Salomonsson S., Larsson P., Tengner P., Mellquist E., Hjelmstrom P., Wahren-Herlenius M. Expression of the B cell-attracting chemokine CXCL13 in the target organ and autoantibody production in ectopic lymphoid tissue in the chronic inflammatory disease Sjogren's syndrome. *Scand J Immunol.* 2002;55:336-42.
16. Youinou P., Daridon C., Saraux A., Devauchelle V., Pers JO. Is B-cell the conductor of the lymphocyte orchestra in the salivary glands of patients with primary Sjögren's syndrome. *Clin Exp Rheumatol* 2006; 24: 491-492.
17. Bolstad AI., Eiken HG., Rosenlund B., et al.: Increased salivary gland tissue expression of Fas, Fas ligand, cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4, and programmed cell death 1 in primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 2003; 48:174–185.
18. Fox RI., Stern M.: Sjögren's syndrome: mechanisms of pathogenesis involve interaction of immune and neurosecretory systems. *Scand J Rheumatol* 2002; 116:3–13.
19. Beroukas D., Hiscock J., Gannon BJ., et al.: Selective down-regulation of aquaporin-1 in salivary glands in primary Sjögren's syndrome. *Lab Invest* 2002; 82:1547–1552.
20. Hansen A., Lipsky PE., Dorner T. New concepts in the pathogenesis of Sjögren syndrome: many questions, fewer answers. *Curr Opin Rheumatol* 2003; 15:563–570
21. Dawson LJ., Stanbury J., Venn N., Hasdimir B., Rogers SN., Smith PM. Antimuscarinic Antibodies in Primary Sjögren's Syndrome Reversibly Inhibit the Mechanism of Fluid Secretion by Human Submandibular Salivary Acinar Cells. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 1165–1173
22. Skopouli FN., Dafni U., Ioannidis JP., Moutsopoulos HM. Clinical evolution, and morbidity and mortality of primary Sjogren's syndrome. *Semin Arthritis Rheum* 2000; 29:296-304
23. Rolando M. Sjogren's syndrome as seen by an ophthalmologist. *Scand J Rheumatol* 2001; S115: 27-33
24. Soto-Rojas AE., Kraus A. The oral side of Sjogren's syndrome. Diagnosis and treatment. A Review. *Arch Med Research* 2002; 33:95-106
25. Hamburger J. Sjogren's syndrome as seen by an oral physician. *Scand J Rheumatol* 2001; S115: 34-39
26. Ramos-Casals M., Font J., Garcia-Carrasco M., Brito MP., Rosas J., Calvo-Alen J et al. Primary Sjogren syndrome: hematologic patterns of disease expression. *Medicine (Baltimore)* 2002; 81: 281-292

27. Tsioufas AG., Boumba DS., Skopouli FN., Moutsopoulos HM. Mixed monoclonal cryoglobulinemia and monoclonal rheumatoid factor cross-reactive idiotypes as predictive factors for the development of lymphoma in primary Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1996; 39: 767-772
28. Voulgarelis M., Dafni UG., Isenberg DA., Moutsopoulos HM. Malignant lymphoma in primary Sjogren's syndrome: a multicenter, retrospective, clinical study by the European Concerted Action on Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1999; 42: 1765-1772
29. Baldini C., Tavoni A., Merlini G., Sebastiani M., Bombardieri S. Sindrome di Sjogren primitiva: descrizione clinica e sierologica di una casistica monocentrica. *Reumatismo*, 2005; 57(4):256-261
30. Praprotnik S., Bozic B., Kveder T., Rozman B. Fluctuation of anti-Ro/SSA antibody levels in patients with systemic lupus erythematosus and Sjogren's syndrome: a prospective study. *Clin Exp Rheumatol* 1999; 17:63-68
31. Lochte H, Pelck R., Manthorpe R. Clinical manifestations correlated to the prevalence of autoantibodies in a large cohort of patients with primary Sjogren's syndrome. A comparison of patients initially diagnosed according to the Copenhagen classification criteria with the American-European consensus criteria. *Autoimmun Rev* 2005; 4:276-281
32. Meyer O. Anti-SSA/Ro and anti-SSB/La antibodies. What's new? *Ann Med Interne (Paris)*. 2002;153:520-9
33. Ulbricht KU., Schmidt RE., Witte T. Antibodies against alpha-fodrin in Sjogren's syndrome. *Autoimmun Rev* 2003; 2: 109-113
34. Vitali C, Bombardieri S., Moutsopoulos HM., Balestrieri G., Bencivelli W., Bernstein RM., Bjerrum KB., Braga S., Coll J., de Vita S., et al. Preliminary criteria for the classification of Sjogren's syndrome. Results of a prospective concerted action supported by the European Community. *Arthritis Rheum* 1993; 36:340- 347.
35. Vitali C., Moutsopoulos HM., Bombardieri S. The European Community Study Group on diagnostic criteria for Sjogren's syndrome. Sensitivity and specificity of tests for ocular and oral involvement in Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 1994; 53: 637-647
36. Vivino FB., Gala I. Hermann GA. Change in Final Diagnosis on Second Evaluation of Labial Minor Salivary Gland Biopsies. *J. Rheumatol* 2002; 29: 938-944
37. Greenspan JS, Daniels TE, Talal N, Sylvester RA. The histopathology of Sjogren's syndrome in labial salivary gland biopsies. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1974; 37: 217-229

38. Daniels TE. Labial salivary gland biopsy in Sjogren's syndrome. Assessment as a diagnostic criterion in 362 suspected cases. *Arthritis Rheum* 1984; 27:147-156
39. Pijpe J., Kalk WWI., Bootsma H., Spijkervet FKL., Kallenberg CGM., Vissink A. Progression of salivary gland dysfunction in patients with Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 2007;66: 107-112
40. Stuchell RN., Mandel ID., Baumhart H. Clinical utilization of sialochemistry in Sjogren's syndrome. [J Oral Pathol](#). 1984;13:303-309
41. Cuida M., Halse AK., Johannessen AC., Tynning T., Jonsson R. Indicators of salivary gland inflammation in primary Sjogren's syndrome. *Eur J Oral Sci*. 1997;105:228-33.
42. van der Reijden WA., van der Kwaak JS., Veerman EC., Nieuw Amerongen AV. Analysis of the concentration and output of whole salivary constituents in patients with Sjogren's syndrome. *Eur J Oral Sci*. 1996;104: 335-340
43. Moutsopoulos HM, Karsh J, Wolf RO, Tarpley TM, Tylden A, Papadopoulos NM. Lysozyme determination in parotid saliva from patients with Sjogren's syndrome. *Am J Med* 1980; 69:39-42
44. Jezequel N., Depasse F., Jouquan J., Lelong A., Roncin S., Pare G., Pennec YL., Youinou P. Salivary lactoferrin in primary Sjogren's syndrome. *Clin Exp Rheumatol*. 1989;7:123-5
45. Sreebny L., Zhu WX. Whole saliva and the diagnosis of Sjogren's syndrome: an evaluation of patients who complain of dry mouth and dry eyes. Part 1: Screening tests. *Gerodontology*. 1996;13:35-43
46. Wu AJ, Lafrenie RM, Park C et al. Modulation of MMP-2 (gelatinase A) and MMP-9 (gelatinase B) by interferon-gamma in a human salivary gland cell line. *J Cell Physiol* 1997;171:117-24.
47. Hernandez CC, Donadi EA, Reis ML. Kininogen-kallikrein-kinin system in plasma and saliva of patients with Sjogren's syndrome. *J Rheumatol* 1998;25:2381-4.
48. Kalk WWI., Vissink A., Stegenga B., Bootsma H., Nieuw Amerongen AV., Kallenberg CGM. Sialometry approach for diagnosing Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 2002;61;137-144
49. Choudhary J., Grant SGN. Proteomics in postgenomic neuroscience: the end of the beginning. *Nature Neuroscience* 2004; 5: 440-445.
50. Godovac-Zimmermann J., Soskic V., Poznanovic S., Brianza F. Functional proteomics of signal transduction by membrane receptors. *Electrophoresis* 1999; 20: 952-961.

51. Imam-Sghiouar N., Laude-Lemaire I., Labas V., Pflieger D., Le Caer JP., Caron M., Nabias DK., Joubert-Caron R. Subproteomics analysis of phosphorylated proteins: application to the study of B-lymphoblast from a patient with Scott syndrome. *Proteomics* 2002; 2: 828-838.
52. Graves PR., Haystead ATJ. *Molecular Biologist's Guide to Proteomics Microbiology and Molecular Biol Rev* 2002; 66: 39-63
53. Pandey A., Mann M. Proteomics to study genes and genomes. *Nature* 2000; 405: 837-846.
54. Phizicky E., Bastiaens PI., Zhu H., Snyder M., Fields S. Protein analysis on a proteomic scale. *Nature* 2003; 422: 208-215.
55. Berkelman T., Stenstedt T. 2-D Electrophoresis, using immobilized pH gradients. *Principles and Methods. Amersham Biosciences* 2002; 17-22.
56. Klose J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutation in mammals. *Humangenetik* 1975; 26: 231-243.
57. Gorg A., Postel W., Gunther S., Weser J. Improved horizontal two-dimensional electrophoresis with hybrid isoelectric focusing in immobilized pH gradients in the first dimension and laying-on transfer to the second dimension. *Electrophoresis* 1985; 6: 599-604.
58. Sanchez JC., Rouge V., Pisteur M., Ravier F., Tonella L., Moosmayer M., Wilkins MR., Hochstrasser DF. "Improved and simplified in-gel sample application using reswelling of dry immobilized pH gradients". *Electrophoresis* 1997; 18: 324-327.
59. Candiano G., Bruschi M., Musante L., Santucci L., Ghiggeri GM., Carnemolla B., Orecchia P., Zardi L., Righetti PG. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis* 2004; 25: 1327-1333.
60. Wilkins MR., Williams KL., Appeal RD., Hochstrasser DF. *Proteome research: new frontiers in functional genomics. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg* 1997; 1-12.
61. Godovac-Zimmermann J., Brown L. *Perspectives for Functional Proteomics and Mass Spectrometry. Mass. Spec. Reviews*, 2001, 20: 1-57
62. Aebersold R., Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 2003; 422: 198-207
63. Fusaro VA., Stone JH. Mass spectrometry-based proteomics and analyses of serum: a primer for the clinical investigator. *Clin Exp Rheumatol.* 2003; 21(S32):S3-14

64. Westermier R., Loland S., Asbury R. La tecnologia proteomica. *Journal of Clinical ligand assay*. 2002. 25: 250-260
65. Bonk T., Humeny A. MALDI-TOF-MS Analysis of Protein and DNA. *The Neuroscientist* 2001; 1: 6-12
66. Langen H., Berndt P., Roder D., Cairns N., Lubec G., Fountoulakis M. Two-dimensional map of human brain proteins". *Electrophoresis* 1999; 20: 907-916.
67. Husi H., Grant SGN. Proteomics of the nervous system. *Trends in Neurosciences* 2001; 5: 259-266
68. Humphrey SP., Williamson RT. A review of saliva: Normal composition, flow, and function. *The journal of prosthetic dentistry* 2001; 85: 162-169.
69. Amado FML., Vitorino RMP., Domingues PMDN., Lobo MJC., Duarte JAR. Analysis of the human saliva proteome. *Expert Rev Proteomics* 2005; 2:521-539
70. Kaufman E., Lamster IB. The diagnostic application of saliva-a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002; 13: 197-212.
71. Drake RR., Cazare LH., Semmes OJ., Wadsworth JT. Serum, salivary and tissue proteomics for discovery of biomarkers for head and neck cancers. *Expert Rev Mol Diagn.* 2005;5:93-100.
72. Huang CM. Comparative proteomic analysis of human whole saliva. *Arch Oral Biol* 2004; 49: 951-962
73. Vitorino R., Lobo M. J., Ferrer-Correira A. J., Dubin, J. R., Tomer K. B., Domingues, P. M., Amado F. M. Identification of human whole saliva protein components using proteomics. *Proteomics* 2004; 4: 1109 -1115
74. Hirtz C., Chevalier F., Centeno D., Egea JC., Rossignol M., Sommerer N., de Périère D. Complexity of the human whole saliva proteome. *J Physiol Biochem* 2005; 61: 469-480
75. Yao Y., Berg EA., Costello CE., Troxler RF, Oppenheim FG Identification of Protein Components in Human Acquired Enamel Pellicle and Whole Saliva Using Novel Proteomics Approaches 2003; 278: 5300-5308
76. Kojima T., Andersen E., Sanchez J. C., Wilkins M. R., Hochstrasser D. F., Pralong W. F., Cimasoni G. Human gingival crevicular fluid contains MRP8 (S100A8) and MRP14 (S100A9), two calcium-binding proteins of the S100 family. *J Dent. Res.* 2000; 79: 740-747.
77. Hardt M, Thomas LR., Dixon SE., Newport G., Agabian N., Prakobphol A., Hall SC., Witkowska HE., Fisher SJ. Toward Defining the Human Parotid Gland Salivary Proteome

and Peptidome Identification and Characterization Using 2D SDS-PAGE, Ultrafiltration, HPLC and Mass Spectrometry. *Biochemistry* 2005; 44: 2885-2899

78. Hu S., Denny P., Xie Y., Loo JA., Wolinsky LE., Li Y., McBride J., Ogorzalek Loo RR., Navazesh M., Wong DT. Differentially expressed protein markers in human submandibular and sublingual secretions. *Int J Oncol* 2004; 25:1423-30.

79. Yang LL., Liu XQ., Liu W., Cheng B., Li MT. Comparative analysis of whole saliva proteomes for the screening of biomarkers for oral lichen planus. *Inflamm Res* 2006; 55:405-7

80. Wong DT. Salivary diagnostics for oral cancer. *J Calif Dent Assoc* 2006;34:303-8

81. Ryu OH., Atkinson JC., Hoehn GT., Illei GG., Hart TC. Identification of parotid salivary biomarkers in Sjogren's syndrome by surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and two-dimensional difference gel electrophoresis. *Rheumatology (Oxford)* 2006;45:1077-86.

82. Hermansson M., Sawaji Y., Bolton M., Alexander S., Wallace A., Begum S., Wait R., Saklatvala J. Proteomic analysis of articular cartilage shows increased type II collagen synthesis in osteoarthritis and expression of inhibin betaA (activin A), a regulatory molecule for chondrocytes. *J Biol Chem* 2004; 279:43514-21

83. De Ceuninck F., Marcheteau E., Berger S., Caliez A., Dumont V., Raes M., Anract P., Leclerc G., Boutin JA., Ferry G. Assessment of some tools for the characterization of the human osteoarthritic cartilage proteome. *J Biomol Tech* 2005;16: 256-65.

84. Ruiz-Romero C., Lopez-Armada MJ., Blanco FJ. Proteomic characterization of human normal articular chondrocytes: a novel tool for the study of osteoarthritis and other rheumatic diseases. *Proteomics* 2005;5:3048-59.

85. Sinz A., Bantscheff M., Mikkat S., Ringel B., Drynda S., Kekow J., Thiesen HJ, Glocker MO. Mass spectrometric proteome analyses of synovial fluids and plasmas from patients suffering from rheumatoid arthritis and comparison to reactive arthritis or osteoarthritis. *Electrophoresis* 2002; 23:3445-56

86. Liao H., Wu J., Kuhn E., Chin W., Chang B, Jones MD., O'Neil S., Clauser KR., Karl J., Hasler F., Roubenoff R., Zolg W., Guild BC. Use of mass spectrometry to identify protein biomarkers of disease severity in the synovial fluid and serum of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2004;50:3792-803

87. Drynda S., Ringel B., Kekow M., Kuhne C., Drynda A., Glocker MO., Thiesen HJ., Kekow J. Proteome analysis reveals disease-associated marker proteins to differentiate RA

- patients from other inflammatory joint diseases with the potential to monitor anti-TNFalpha therapy. *Pathol Res Pract* 2004;200:165-71
88. de Seny D., Fillet M., Meuwis MA., Geurts P., Lutteri L., Ribbens C., Bours V., Wehenkel L., Piette J., Malaise M., Merville MP. Discovery of new rheumatoid arthritis biomarkers using the surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry ProteinChip approach. *Arthritis Rheum* 2005; 52:3801-12
89. An Y., Pu H., He SZ., Li ZG. Identification of biomarkers in serum of early rheumatoid arthritis by proteomic methods *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2005;85:1261-5
90. Tilleman K., Van Beneden K., Dhondt A., Hoffman I., De Keyser F., Veys E., Elewaut D., Deforce D. Chronically inflamed synovium from spondyloarthropathy and rheumatoid arthritis investigated by protein expression profiling followed by tandem mass spectrometry. *Proteomics*. 2005; 5:2247-57
91. Miyamae T., Malehorn DE., Lemster B., Mori M., Imagawa T., Yokota S., Bigbee WL., Welsh M., Klarskov K., Nishimoto N, Vallejo AN., Hirsch R. Serum protein profile in systemic-onset juvenile idiopathic arthritis differentiates response versus nonresponse to therapy. *Arthritis Res Ther* 2005;7:R746-55.
92. Tomosugi N., Kitagawa K., Takahashi N., Sugai S., Ishikawa I. Diagnostic potential of tear proteomic patterns in Sjogren's syndrome. *J Proteome Res* 2005;4:820-5.
93. Stone JH., Rajapakse VN., Hoffman GS., Specks U., Merkel PA., Spiera RF., Davis JC., St Clair EW., McCune J., Ross S., Hitt BA., Veenstra TD., Conrads TP., Liotta LA., Petricoin EF 3rd; Wegener's Granulomatosis Etanercept Trial Research Group. A serum proteomic approach to gauging the state of remission in Wegener's granulomatosis. *Arthritis Rheum* 2005;52:902-910.
94. Fietta A., Bardoni A., Salvini R., Passadore I., Morosini M., Cavagna L., Codullo V., Pozzi E., Meloni F., Montecucco C. Analysis of bronchoalveolar lavage fluid proteome from systemic sclerosis patients with or without functional, clinical and radiological signs of lung fibrosis. *Arthritis Res Ther*. 2006; 8:R160
95. Atzeni F., Bardoni A., Cutolo M., Hunzelmann N., Krieg T., Martini G., Montecucco C., Olski TM., Secchi ME., Valentini G., Zulian F., Sarzi-Puttini P. Localized and systemic forms of scleroderma in adults and children. *Clin Exp Rheumatol* 2006; 24 (S 40):S36-45
96. Denton CP., Black CM., Abraham DJ. Mechanisms and consequences of fibrosis in systemic sclerosis. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2006; 2:134-144
97. Hummers LK. Microvascular damage in systemic sclerosis: detection and monitoring with biomarkers. *Curr Rheumatol Rep* 2006;8:131-137

98. Mason GI., Hamburger J., Matthews JB. Mast cells, extracellular matrix components, TGF β isoforms and TGF β receptor expression in labial salivary glands in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2000; 59:183-189
99. Chisolm DM et al. Labial salivary gland biopsy in Sjogren's syndrome. *Clin Pathol* 1968; 21:656-60
100. Subcommittee for Scleroderma Criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and therapeutic Criteria Committee. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum* 1980; 23: 581-590
101. Peterson GL. Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. *Anal Biochem* 1979; 100: 201-220
102. Baldini C., Giusti L., Bazzichi L., Lucacchini A., Ciregia F., Tavoni A., Bombardieri S.. Analisi Proteomica della saliva nei pazienti con Sindrome di Sjogren primitiva. *Reumatismo* 2006, 58(3)
103. Giusti L, Baldini C, Bazzichi L., Ciregia F., Tonazzini I., Mascia G., Giannaccini G., Bombardieri S., Lucacchini A. Siena Proteomics Proceedings. Proteome analysis of whole saliva: a new tool for rheumatic diseases - the example of Sjögren's syndrome. in press
104. Mirels L., Hand AR., Branin HJ. *J Histochem Cytochem* 1998; 46: 1061-1071
105. Kivela J., Parkkila S., Parkkila AK., Leinonen J., Rajaniemi H. Salivary carbonic anhydrase isoenzyme Vi. *J Physiol* 1999; 520: 315-320
106. Navone R., Lunardi C., Gerli R., Tinazzi E., Peterlana D., Bason C., Corrocher R., Puccetti A. Identification of tear lipocalin as a novel autoantigen target in Sjogren's syndrome. *J Autoimmun* 2005; 25: 229-234.

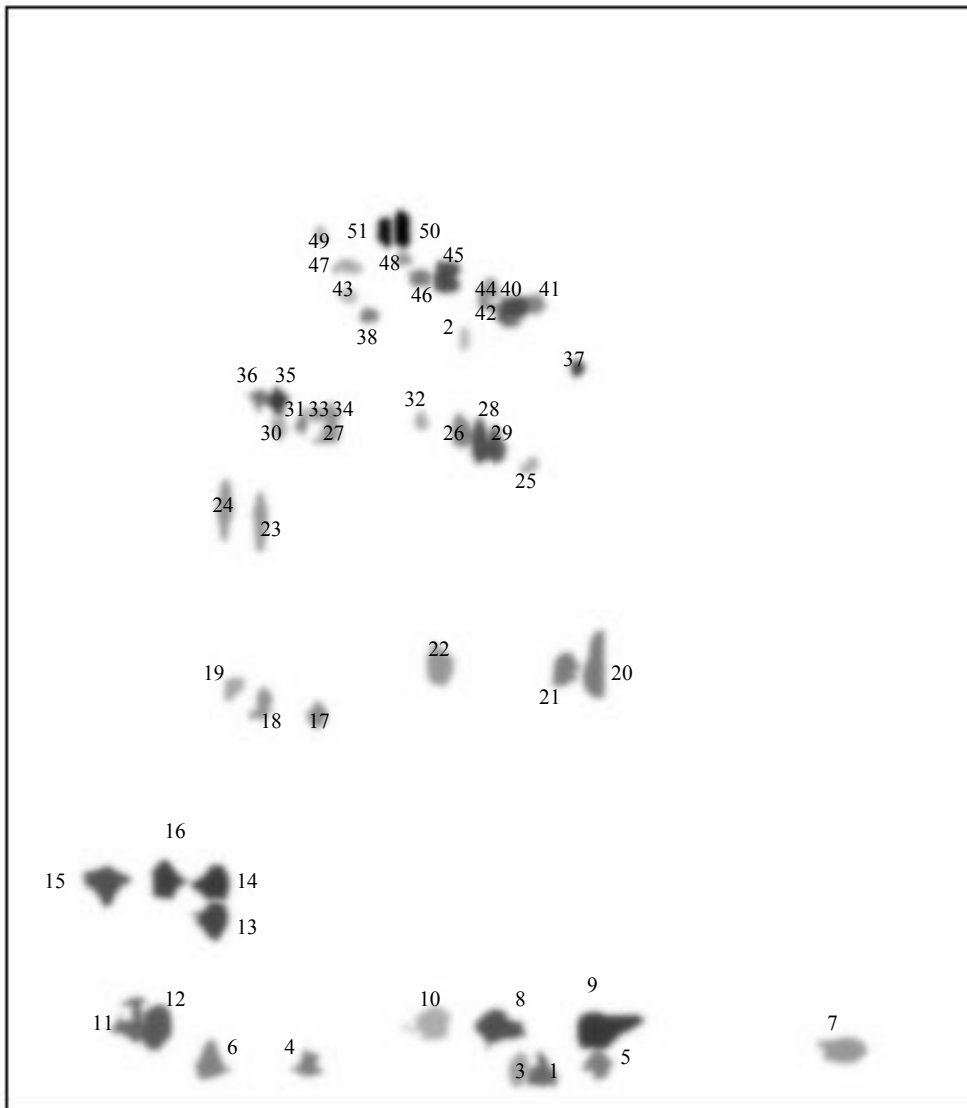


Figura 6: Gel sintetico controllo sano

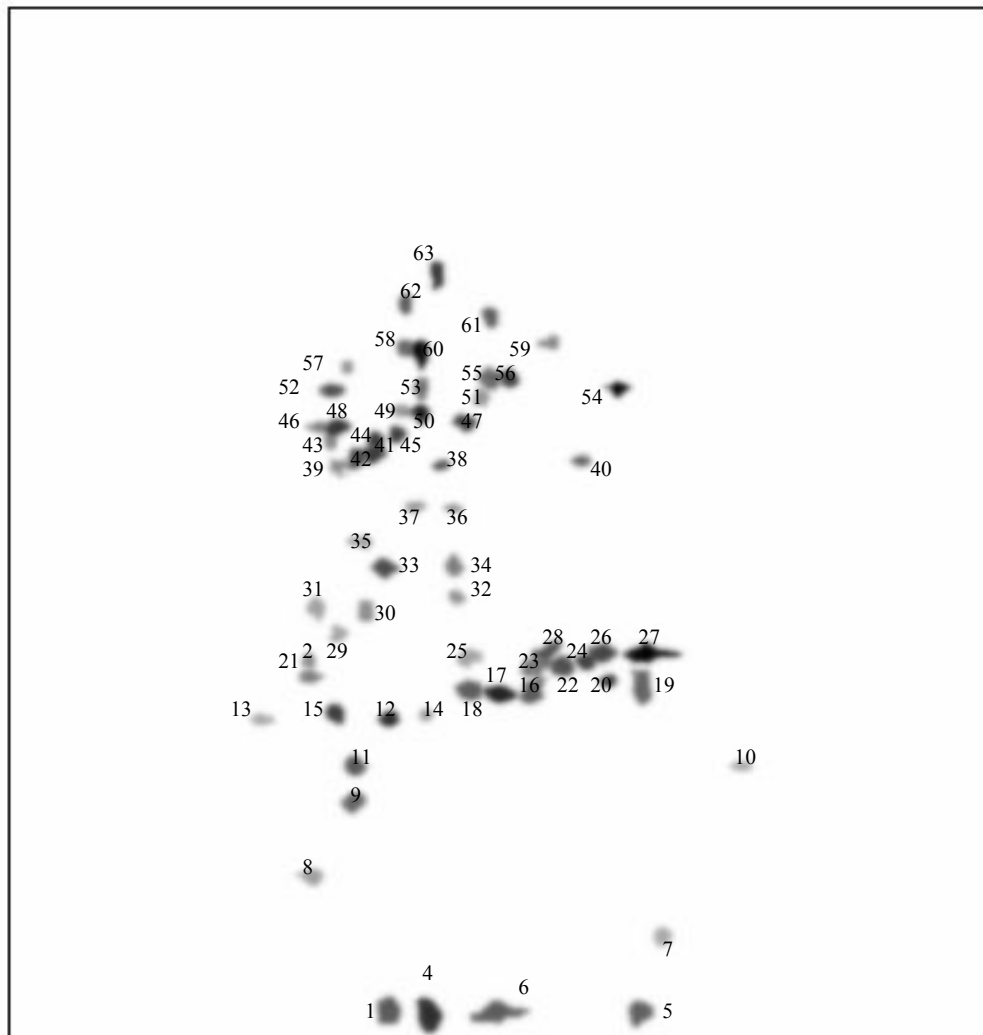


Fig 7: Gel sintetico Sindrome di Sjogren

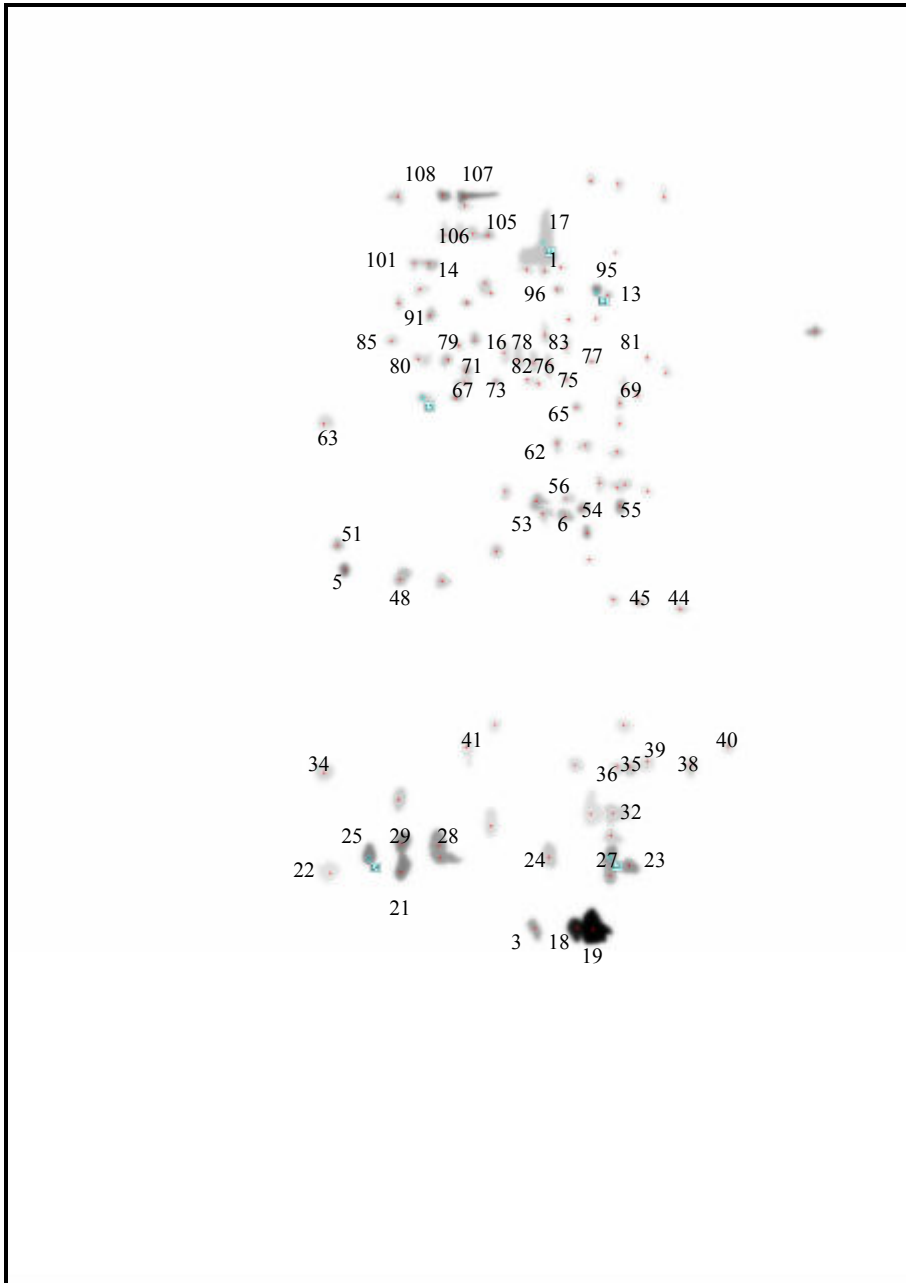


Fig 8: Gel sintetico Sindrome Sicca Idiopatica

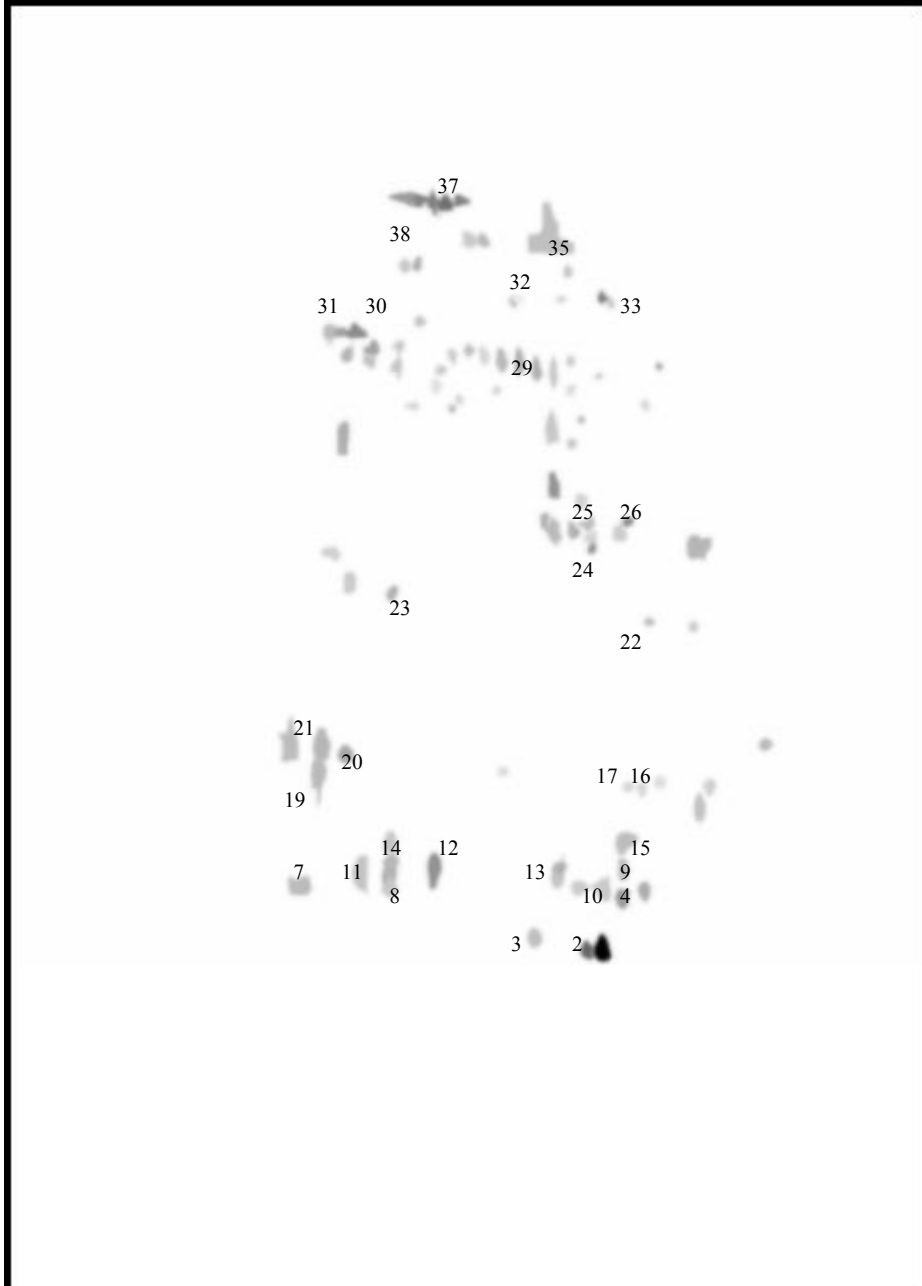


Fig 9: Gel sintetico pazienti con anticorpi anti-Ro/SSA

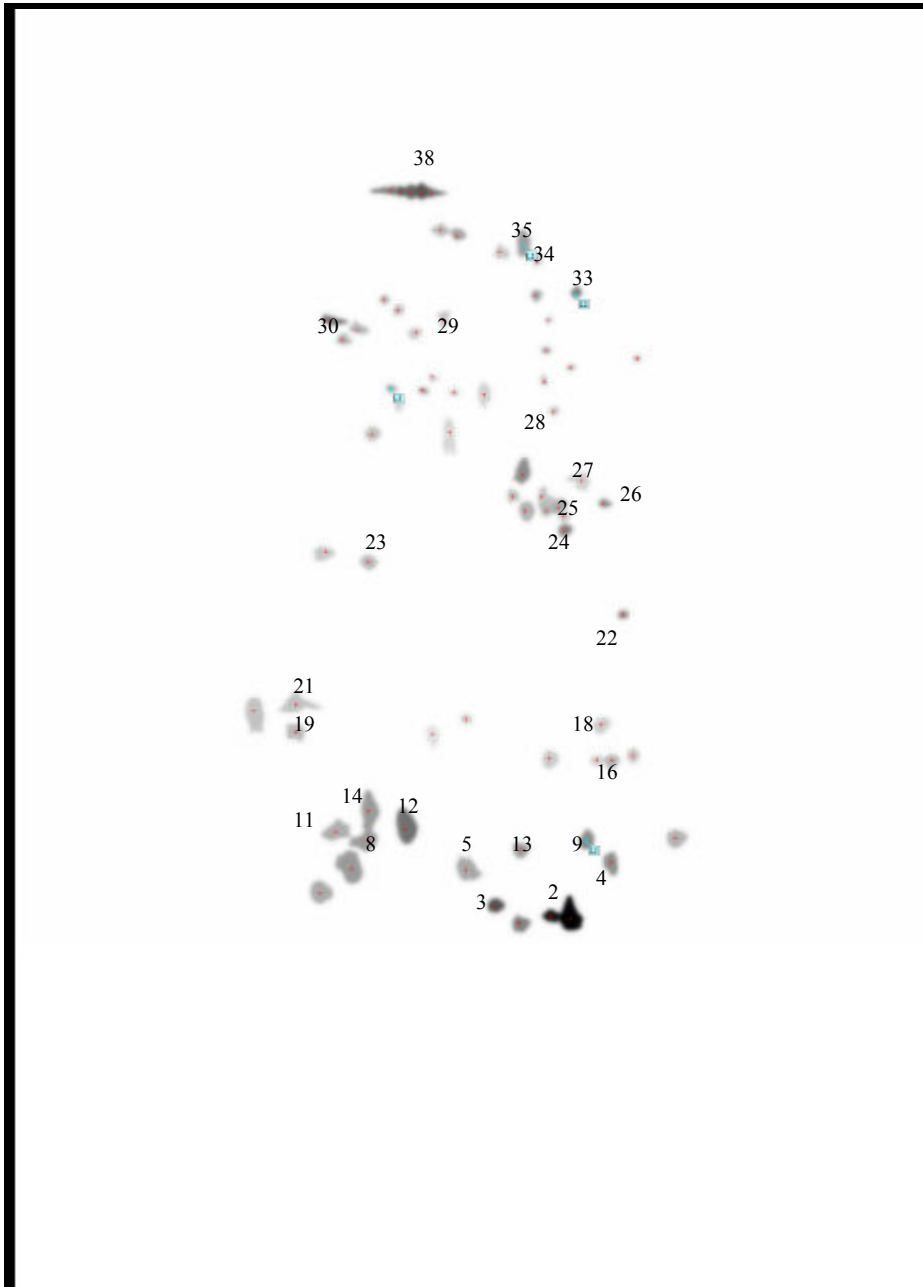


Fig 10: Gel sintetico pazienti con anticorpi anti- Ro/SSA e anti-La/SSB

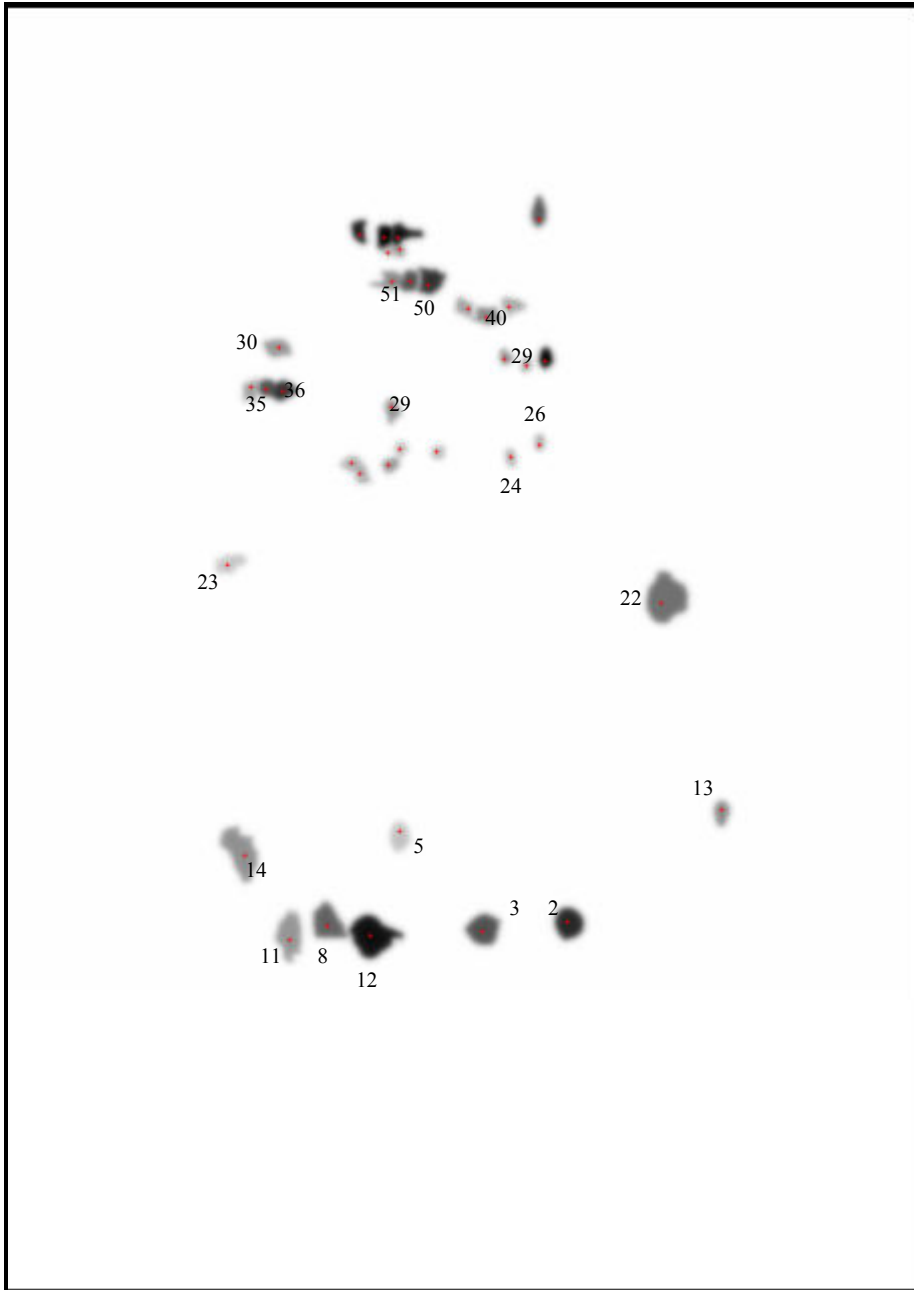


Fig 11. Gel sintetico Sclerosi Sistemica Progressiva

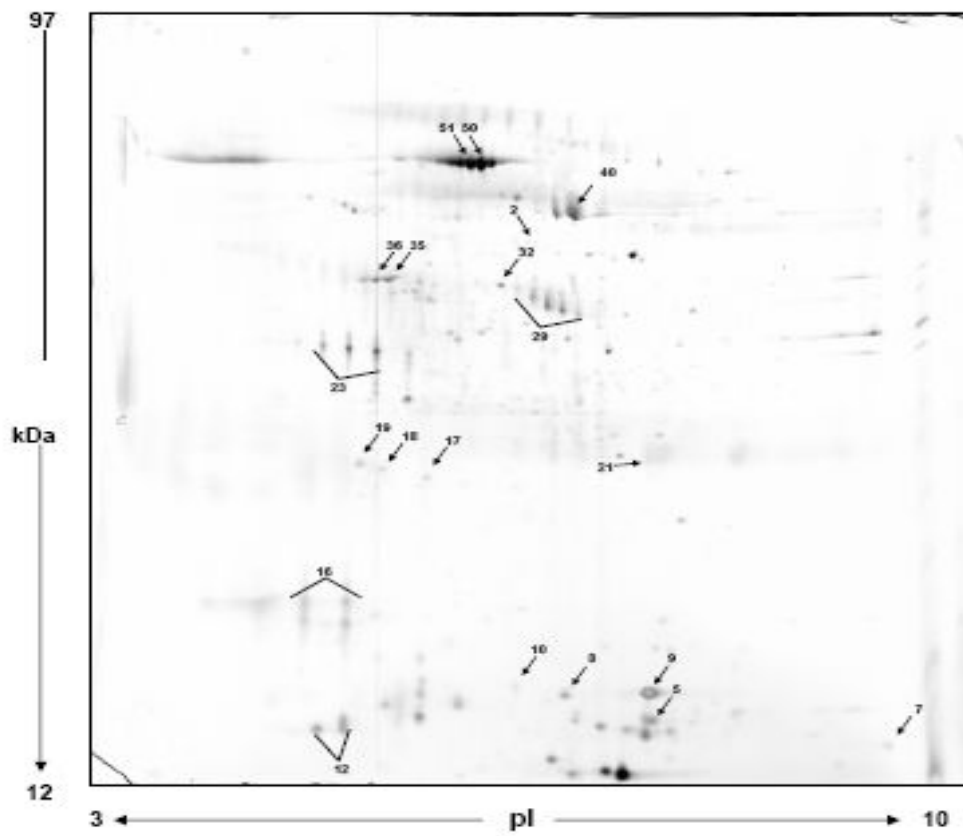


Fig 12: Gel rappresentativo controllo sano

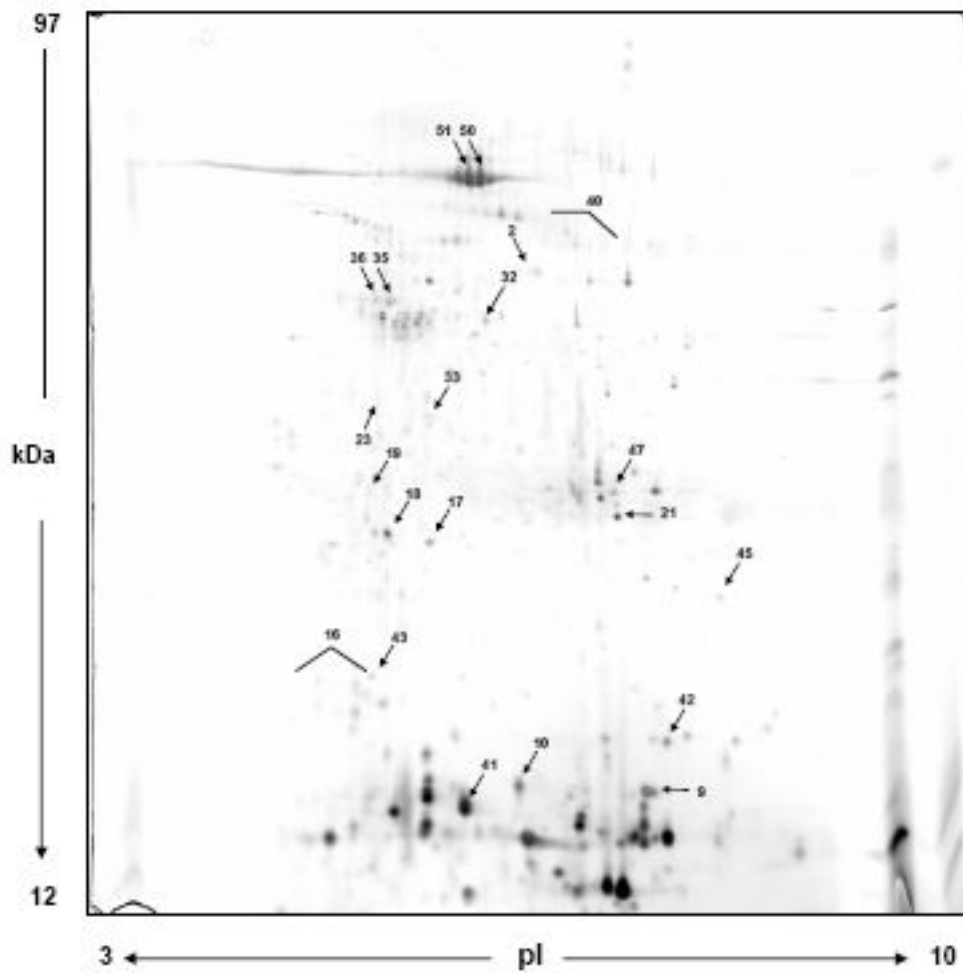


Fig 13: Gel rappresentativo Sindrome di Sjogren

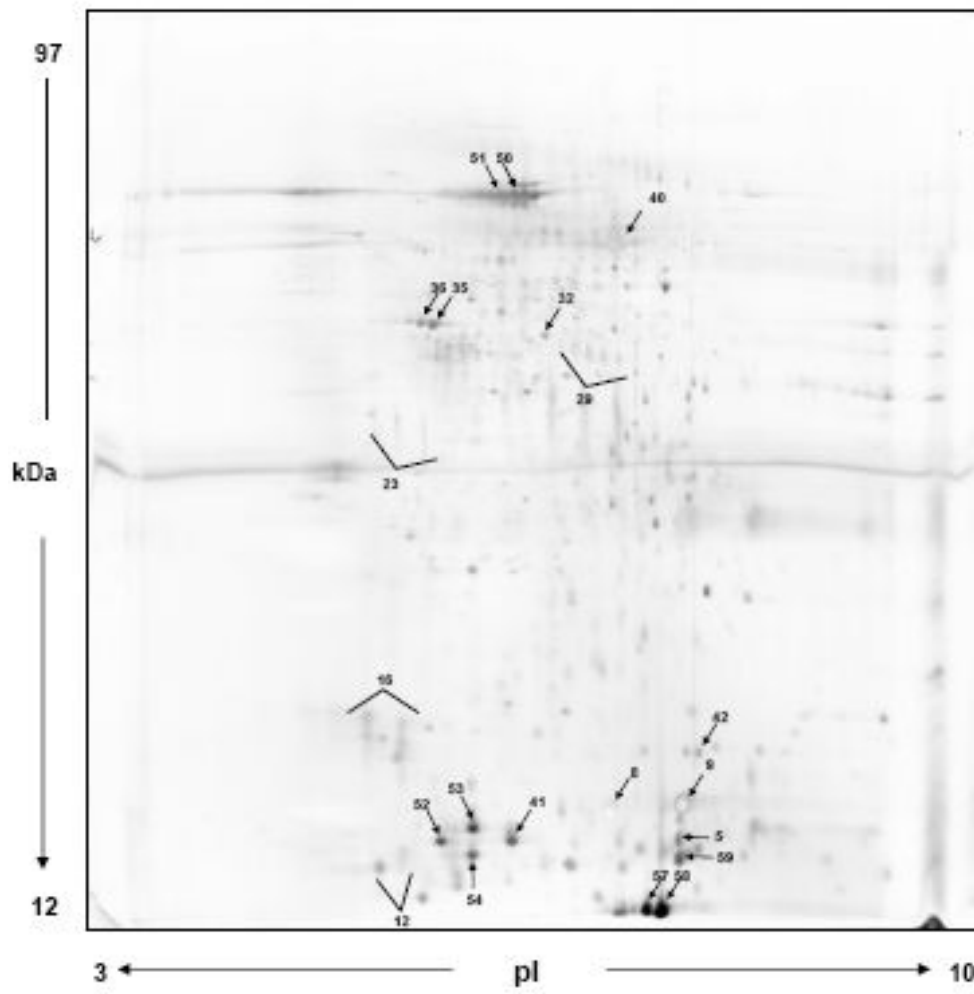


Fig 14: Gel rappresentativo Sindrome Sicca Idiopatica

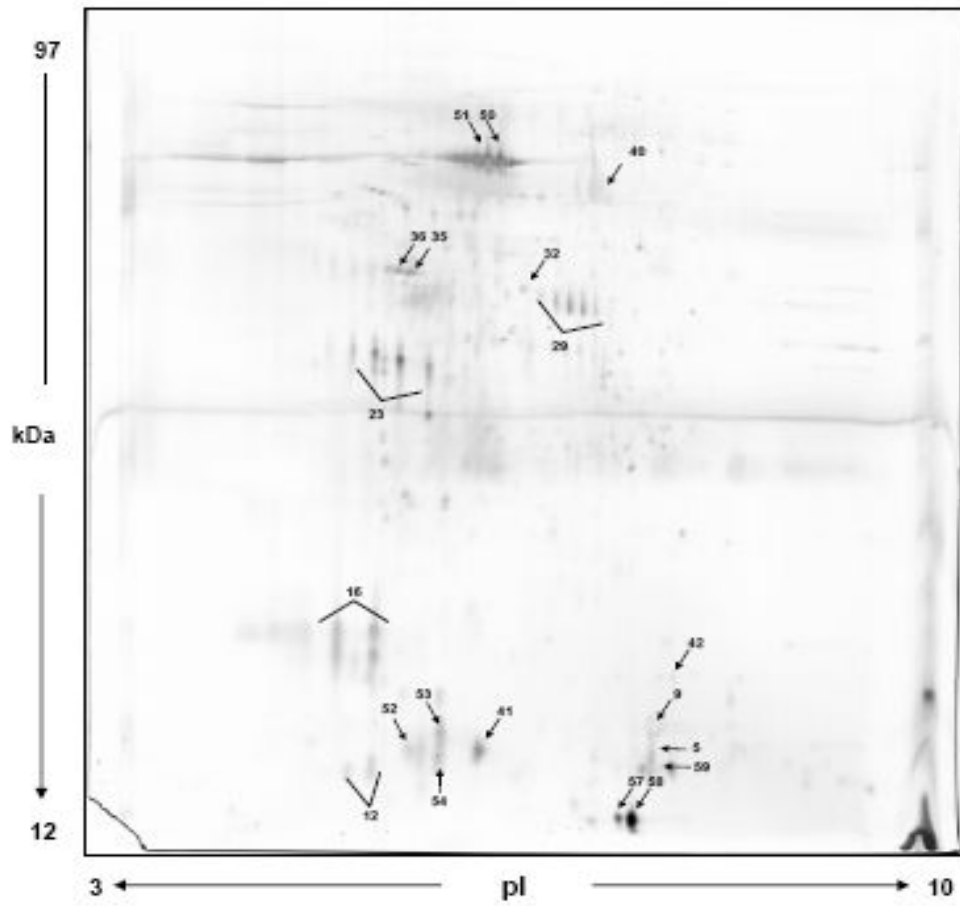


Fig 15: Gel rappresentativo dei pazienti con anticorpi anti-Ro/SSA

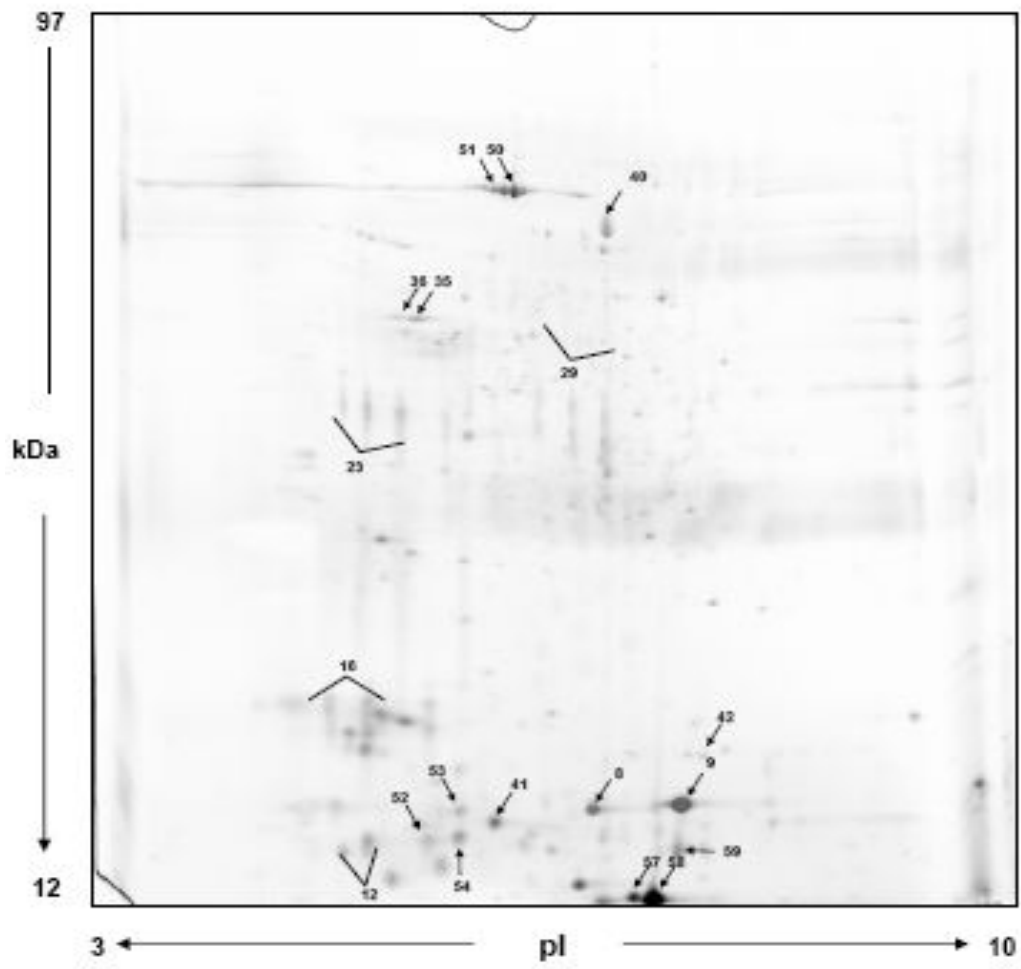


Fig 16: Gel rappresentativo pazienti con anticorpi anti-Ro/SSA e anti-La/SSB

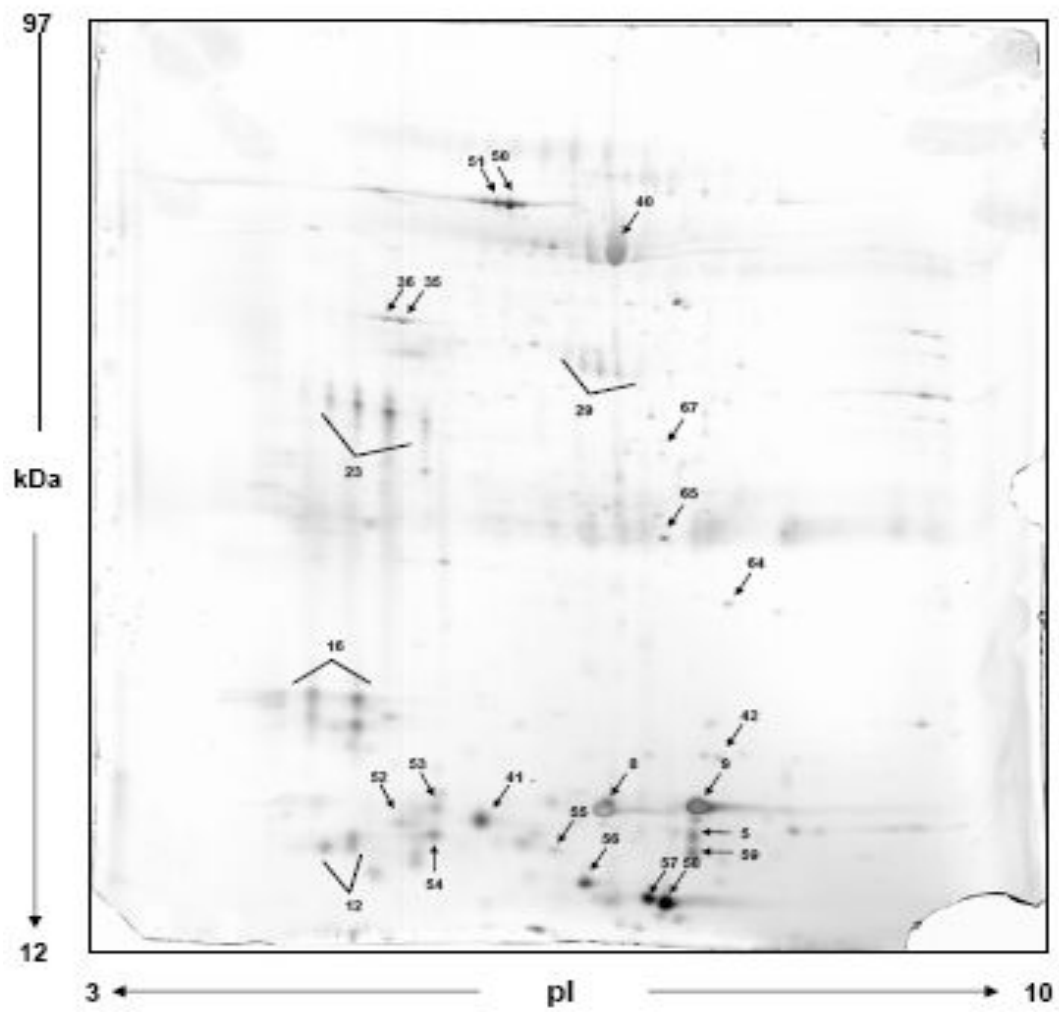


Fig 17: Gel rappresentativo Sclerosi Sistemica Progressiva



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PISA

Facoltà di Medicina e Chirurgia
Dottorato in Fisiopatologia Medica e Farmacologia
Anno Accademico 2005-2006

Tesi di dottorato:

**“Analisi proteomica della saliva
in pazienti affetti da Sindrome di Sjogren primitiva”**

Relatore: Prof. Stefano Bombardieri

Candidato: Chiara Baldini

INDICE:

| | |
|--|-------------------|
| RIASSUNTO | pag. 3-4 |
| I. INTRODUZIONE | |
| Ia. SjS: aspetti epidemiologici, eziopatogenetici, clinici e diagnostici | pag. 5-16 |
| Ib. SjS: modificazioni qualitative e quantitative nella composizione della saliva | pag. 17-18 |
| Ic. La proteomica | pag. 19-26 |
| Id. Applicazioni cliniche dell'analisi proteomica allo studio della saliva | pag. 27-29 |
| II. SCOPO DEL LAVORO | pag. 30-31 |
| III. MATERIALI E METODI | |
| IIIa. Pazienti | pag. 32-33 |
| IIIb. Materiali e strumentazione | pag. 34 |
| IIIc. Raccolta e preparazione del campione | pag. 34-36 |
| IIId. Elettroforesi bidimensionale | pag. 36-42 |
| IIIe. MALDI-TOF | pag. 42-43 |
| IIIf. Analisi statistica | pag. 43 |
| IV RISULTATI | |
| IVa. Analisi dei gel sintetici | pag. 44-50 |
| IVb. Analisi quantitativa delle proteine di interesse | pag. 50-53 |
| V. DISCUSSIONE | pag. 54-57 |
| VI. CONCLUSIONI | pag. 58-59 |
| VII. BIBLIOGRAFIA | pag. 60-68 |
| ALLEGATI | pag. 69-80 |

RIASSUNTO

La Sindrome di Sjogren primitiva (SjS) è una malattia autoimmune sistemica a patogenesi multifattoriale che colpisce in maniera peculiare le ghiandole esocrine salivari e lacrimali. La flogosi cellulo-mediata determina una progressiva compromissione della funzione ghiandolare che si traduce, dal punto di vista clinico, in una tipica sindrome secca caratterizzata da secchezza orale e oculare persistenti.

Scopo del lavoro: considerando la peculiarità della SjS nel coinvolgimento diretto delle ghiandole salivari maggiori e minori, l'ipotesi di lavoro che ha guidato questo studio è stata quella di verificare se il fluido salivare dei pazienti potesse rispecchiare, nella composizione proteica, le alterazioni anatomico-funzionali determinate dalla malattia a livello del tessuto ghiandolare. Scopo del lavoro è stato, quindi, quello di caratterizzare mediante analisi proteomica il profilo proteico salivare di pazienti affetti da SjS e comparare il pattern ottenuto con quello di controlli sani e di un gruppo di controlli "patologici" al fine di identificare eventuali biomarkers di malattia.

Pazienti e metodi: Sono stati arruolati nello studio: 15 pazienti con diagnosi di SjS, formulata in accordo con i Criteri Internazionali validati per la diagnosi di malattia, 15 controlli sani e 30 "controlli patologici" comparabili per sesso ed età. Nell'ambito dei 30 controlli patologici: 15 soggetti risultavano affetti da Sclerodermia sistemica progressiva (malattia autoimmune sistemica in grado di determinare un impegno fibrotico non flogistico delle ghiandole salivari), 6 presentavano una Sindrome Sicca Idiopatica non immunomediata e, 9 soggetti risultavano asintomatici per quanto relativo alla secchezza delle mucose ma erano portatori di autoanticorpi patologici (anti Ro/SSA e anti La/SSB), altamente specifici per la SjS. La caratterizzazione del profilo proteico salivare è stata effettuata combinando l'elettroforesi bidimensionale con la spettrometria di massa (MALDI-TOF mass spectrometry). I campioni sono stati raccolti in condizioni standard, centrifugati a 14000 g per 20 minuti a 4°C per rimuovere materiale insolubile e cellule, opportunamente preparati, e sottoposti ad elettroforesi bidimensionale. La prima dimensione è stata effettuata su strip di 18 cm in cui è presente un gradiente lineare di pH 3-10. La seconda dimensione è stata effettuata su gel di poliacrilammide 12% (20cm×20cm×1,5mm). I gel analitici sono stati colorati mediante Silver staining, mentre i gel preparativi per la spettrometria di massa con il Blu Coomassie Colloidale. Le immagini dei gel sono state acquisite tramite uno scanner (Epson Expression 1680) e analizzate con il programma Image Master 2D Platinum 5.0 dell'Amersham Bioscience. Gli spot di interesse sono stati, infine, identificati mediante MALDI-TOF mass spectrometry.

L'analisi statistica è stata condotta mediante test ANOVA per il confronto delle medie tra più gruppi analizzati simultaneamente e mediante *t*-test per il confronto delle medie dei gruppi a due a due. Un p-value <0.05 è stato considerato statisticamente significativo.

Risultati: Lo studio ha permesso mettere in evidenza numerose differenze tra il pattern proteico salivare dei pazienti con SjS ed i profili proteici salivari dei soggetti sani e dei controlli patologici. In particolare, nei pazienti con SjS è stato possibile osservare una riduzione nei livelli di espressione di alcune tipiche proteine salivari acinari (albumina, α -amilasi salivare, PIP, cheratina 6L, anidrasi carbonicaVI), un'alterata espressione di proteine coinvolte nell'equilibrio proteasi / antiproteasi con una riduzione delle cistatine e dei loro precursori e un incremento dell'inibitore dell'elastasi leucocitaria, un incremento di proteine coinvolte nel danno tissutale (actina, lipocalina-1 precursore) e, infine, un'aumentata espressione di proteine infiammatorie e legate all'autoimmunità (calgranulina B, ciclofillina A, catena leggera κ delle immunoglobuline, beta2-microglobulina).

Conclusioni: Lo studio, seppure preliminare, ha permesso di documentare come il pattern proteico salivare dei pazienti con SjS risulti profondamente alterato e presenti aspetti peculiari che, in parte riflettono l'impegno flogistico selettivo da parte della malattia delle ghiandole salivari, in parte riflettono le alterazioni dell'ambiente orale che essa induce e, in parte, infine, la natura autoimmune sistemica della SjS. L'insieme delle alterazioni osservate suggerisce che il dosaggio dei livelli salivari di un numero limitato di proteine, identificate tramite analisi proteomica, possa costituire un valido ausilio nella diagnosi di malattia, configurando una sorta di algoritmo proteico da applicare soprattutto nei casi che rimangono dubbi nelle indagini di diagnostica tradizionale. Complessivamente, quindi, seppure a livello preliminare, lo studio ha mostrato come l'analisi proteomica di fluidi biologici scarsamente complessi e facilmente reperibili come la saliva possa rappresentare un'ulteriore ausilio nella diagnosi delle malattie reumatiche, in generale, e della SjS in particolare.

I.INTRODUZIONE

Ia. Sindrome di Sjogren: aspetti epidemiologici, eziopatogenetici, clinici e diagnostici

La sindrome di Sjogren (SjS) è una malattia autoimmune sistemica che colpisce caratteristicamente le ghiandole esocrine ed in particolare le ghiandole salivari e quelle lacrimali manifestandosi, clinicamente, con una sindrome secca oculare e orale che deriva dal coinvolgimento anatomico e funzionale delle ghiandole stesse (1).

Dal punto di vista nosografico la malattia può presentarsi in forma isolata (SjS idiopatica o primitiva), oppure in associazione ad altre malattie autoimmuni come l'Artrite Reumatoide, il Lupus Eritematoso Sistemico o la Sclerodermia: si parla in tal caso di SjS secondaria (2).

La SjS primitiva ha una distribuzione ubiquitaria e colpisce preferenzialmente soggetti di sesso femminile (rapporto femmine: maschi = 9:1) con un primo picco di incidenza nella II-III decade di vita ed un secondo picco in età post-menopausale, nella V decade di vita. I dati relativi alla prevalenza e all'incidenza di malattia sono estremamente discordanti e sono condizionati dai criteri classificativi utilizzati nei diversi studi epidemiologici; in tal senso, il tasso di prevalenza della SjS è stimato in un range variabile tra lo 0.15% e il 3.3%, mentre il tasso di incidenza varia da 1: 1000 a 1: 100 a seconda dei diversi studi in esame (3-6). Le discrepanze degli studi epidemiologici condotti sulla malattia possono, almeno in parte essere giustificate dal fatto che criteri classificativi per la SjS primitiva e secondaria, accettati a livello internazionale, sono stati elaborati solo recentemente, nell'ambito dell' American-European Consensus Group nel 2002 (7) (Tabella 1). Utilizzando tali criteri la prevalenza della malattia è stimata pari a circa lo 0.5% nella popolazione adulta (8).

Tabella 1: *American European Consensus Criteria 2002*

| |
|---|
| 1. Sintomi oculari Una risposta positiva almeno ad una delle seguenti domande: Ha sensazione quotidiana di occhi secchi da oltre tre mesi? Ha sensazione di sabbia/corpo estraneo negli occhi? Utilizza lacrime artificiali per più di tre volte al giorno? |
| 2. Sintomi orali Una risposta positiva almeno ad una delle seguenti domande: Ha sensazione quotidiana di bocca secca da oltre tre mesi? Ha tumefazione ricorrente o persistente delle ghiandole salivari? Deve bere molto per inghiottire cibi secchi? |
| 3. Segni Oculari Schirmer test (<5 mm in 5 min) Rosa Bengala positivo |
| 4. Istopatologia Focus score > 1 (Focus: aggregato di almeno 50 cellule mononucleate adiacente ad acino intatto, Focus score numero di foci per 4 mmq) |
| 5. Impegno delle ghiandole salivari Scintigrafia salivare Scialografia parotidea Riduzione del flusso salivare (< 1,5 ml in 15 min) |
| 6. Autoanticorpi Ro-SSA e/o La-SSB |

Per SjS primario:

- Presenza di 4 criteri su sei positivi di cui almeno uno sia rappresentato dall'istopatologia o dalla sierologia
- Presenza di 3 dei 4 criteri "obiettivi" (punti 3 ,4 ,5 ,6)

Per SjS secondario: criteri 1 e 2 + almeno due tra 3, 4 e 5

Criteri di esclusione: radioterapia, HCV, AIDS, linfoma pre-esistente, sarcoidosi, GVHD, uso di farmaci anticolinergici

Dal punto di vista eziopatogenetico la SjS è descritta come un processo sequenziale “multistep” di tipo multifattoriale che sembrerebbe originare dall’interazione tra fattori di predisposizione genetica e agenti esogeni ambientali in grado di innescare risposte autoimmunitarie abnormi, sia da parte dei linfociti T che dei linfociti B, rivolte contro auto-antigeni tissutali; tali risposte sarebbero in grado di sostenere, perpetuare e amplificare il danno tissutale portando ad uno stato infiammatorio cronico e ad una progressiva perdita funzionale degli organi colpiti (2). I fattori di predisposizione genetica suggeriti sono essenzialmente rappresentati dai geni del sistema maggiore di istocompatibilità (HLA). La SjS è, infatti, strettamente associata all’espressione dell’HLA-DR3 e dei geni ad esso correlati B8 e DQ2. Tale associazione è particolarmente forte per i soggetti con SjS che producono anticorpi anti-Ro/SSA (9). Oltre al sistema HLA gli studi più recenti hanno focalizzato l’attenzione su geni polimorfici che codificano per molecole coinvolte fisiologicamente nella risposta immunitaria come il gene dell’IL-10 (aplotipo GCC), il gene del TNF alfa (allele TNF-308A) e il gene della catena alfa del recettore dell’IL4. Altri polimorfismi genici sono stati osservati a carico del gene della lectina legante il mannosio e dei recettori di alcune chemochine, in particolare del recettore CCR5 che lega le chemochine chemoattrattanti delle cellule mononucleari CCL3, CCL4 e CCL5 (10). Anche gli agenti ambientali legati alla patogenesi della SjS sono molteplici ma, in primis, sono chiamati in causa fattori ormonali (ruolo protettivo degli androgeni e pro-infiammatorio degli estrogeni che sembrerebbero contrastare l’apoptosi dei cloni linfocitari auto-reattivi) e numerosi agenti virali scialotropi come il virus di Epstein-Barr (EBV), il virus dell’epatite C (HCV) ed il retrovirus-I della leucemia umana a cellule T (HTLV-I) (10). Negli ultimi anni, il gruppo di Moutsopoulos ha identificato la presenza di RNA virale di Coxsackie virus nelle biopsie delle ghiandole salivari minori di pazienti con SjS e un’omologia di sequenza dell’87% tra un peptide derivato dalla proteina 2B dei Coxsackievirus e la regione 222-229 dell’epitopo lineare maggiore dell’auto-antigene Ro60KD, che è considerato uno degli auto-antigeni più specifici della SjS (11).

Alla luce delle più recenti acquisizioni, anche se l’eziologia della SjS rimane ancora in larga parte sconosciuta, sono stati elaborati diversi modelli patogenetici in grado di spiegare il ruolo dei diversi elementi cellulari nel danno ghiandolare che si verifica in corso di malattia. Il modello patogenetico più largamente condiviso è quello dell’“epitelite autoimmune” secondo il quale le cellule epiteliali rivestirebbero un ruolo cruciale nella formazione degli aggregati linfocitari periduttali (12). La SjS presenta, infatti, un quadro istopatologico caratterizzato da infiltrati linfocitari focali che interessano generalmente la

regione periduttale delle ghiandole esocrine ma che potenzialmente possono colpire qualunque organo e apparato (es. epitelio tubulare renale, epitelio bronchiale, epitelio dei colangioli epatici etc). Tali aggregati originano essenzialmente dalle interazioni tra le cellule epiteliali e le cellule immuni T e B. Gli aggregati linfocitari sono costituiti essenzialmente da linfociti CD4⁺ positivi che presentano essenzialmente un fenotipo memoria (CD45 RO⁺), esprimono il recettore TCR α/β e sono in grado di secernere INF- γ e IL-10. In percentuale minore sono stati evidenziati anche linfociti T CD8⁺ positivi che esprimono l'integrina (CD 103) e che si localizzano in prossimità di cellule epiteliali acinari E-caderina positive. Il rapporto CD4/CD8 a livello degli infiltrati è di 3:1-5:1. I linfociti B costituiscono solo il 20% degli infiltrati, e ancora più rari sono le cellule natural killer ed i macrofagi (complessivamente < 5%). Accanto agli infiltrati T linfocitari è possibile osservare frequentemente anche delle strutture ectopiche che sono analoghe ai centri germinativi e sono costituite essenzialmente da linfociti B, con una piccola percentuale di linfociti T e di cellule follicolari dendritiche. I linfociti B sono organizzati in una 'dark zone' centrale in attiva proliferazione (centroblasti) e in una zona più periferica 'light zone' di centrociti che vanno incontro a processi di selezione per l'espressione in superficie di anticorpi ad alta affinità. La presenza di questi centri germinativi ectopici è stata associata ad una più elevata positività di autoanticorpi anti Ro/SSA ed anti La/SSB, nonché ad un più alto rischio di trasformazione in senso linfoproliferativo (10). Secondo il "modello epitelitico" le cellule epiteliali, una volta attaccate da un ipotetico agente esogeno, si attiverebbero e inizierebbero a secernere elevate quantità di citochine pro-infiammatorie ed ad esprimere alti livelli di HLA DR richiamando in situ le cellule linfocitarie. Le cellule dell'epitelio ghiandolare fungerebbero da cellule presentanti l'antigene (APC) attivando i linfociti che potrebbero, a loro volta, interagire con i linfociti B innescando la risposta autoimmune (12). Un secondo modello proposto per la formazione degli aggregati è quello di una *disregolazione sistemica dei linfociti T circolanti*, ed in particolare dei linfociti Th1 positivi, che migrerebbero attivamente nelle ghiandole esocrine con un processo di homing mediato dall'adesione alle venule ad endotelio alto (HEV) fin dalle prime fasi di malattia. I linfociti Th1, attraverso la liberazione di citochine proinfiammatorie, ed in particolare di INF- γ , attiverebbero essi stessi le cellule epiteliali e le indurrebbero ad esprimere potenti chemoattrattanti in grado di richiamare altri linfociti e di amplificare il processo infiltrativo (13). I chemoattrattanti implicati sarebbero le chemochine, proteine a basso peso molecolare in grado di reclutare e attivare specifiche sottopopolazioni leucocitarie, modificando l'espressione e lo stato di

affinità delle molecole di adesione sulla superficie leucocitaria. Sulla scia di questa ipotesi, studi recenti hanno focalizzato l'attenzione, in particolare, su alcune chemochine INF- γ -indotte come la CXCL10 e la CXCL9, il cui mRNA è risultato up-regolato a livello delle cellule epiteliali dei dotti salivari dei pazienti con SjS rispetto ai controlli. Tali chemochine sarebbero in grado, a loro volta, di amplificare il processo richiamando ulteriori linfociti T CD3+ (14). Chemochine diverse come la CXCL13, chemoattrattanti verso i linfociti B, e il BAFF, citochina della superfamiglia del TNF, sarebbero, invece, coinvolte nella formazione delle strutture ectopiche simil germinative il cui ruolo nella successiva potenziale trasformazione linfomatosi rimane da chiarire (15). Recentemente, è stato ipotizzato, inoltre, che il ruolo dei linfociti B possa essere ancora più complesso dal momento che essi stessi sarebbero in grado di polarizzarsi, fungere da APC e produrre INF- γ , influenzando la differenziazione dei T-helper in senso T-helper 1. Questi dati porterebbero l'attenzione sui linfociti B come primi orchestratori del processo infiammatorio a carico delle ghiandole salivari (16). Comunque abbiano origine gli infiltrati linfocitari, una volta formati, essi comportano una progressiva distruzione dell'epitelio ghiandolare. Il principale meccanismo di distruzione dell'epitelio ghiandolare è rappresentato dalla morte cellulare programmata o apoptosi mediata dal sistema Fas/FasL e dal rilascio di perforina e granzima A (17). Anche se è ancora da chiarire se lo stimolo iniziale per il processo apoptotico sia intrinseco alle cellule epiteliali o sia mediato dai linfociti T, la formazione di blebs di membrana durante l'apoptosi porterebbe alla traslocazione a livello di membrana di componenti auto-antigeniche intracellulari che in questo modo guadagnerebbero l'ambiente extracellulare e potrebbero evocare la risposta auto-anticorpale. Un altro ulteriore meccanismo di esposizione di auto-antigeni endocitari sarebbe la liberazione di esosomi da parte delle cellule epiteliali ovvero di vescicole di membrana risultanti dalla fusione di endosomi e lisosomi. Tale meccanismo è stato osservato in vitro ma non ancora in vivo (2). I meccanismi patogenetici descritti giustificano, in realtà, una distruzione del 50-60% delle strutture acinari con una riserva funzionale residua del 40% (18). L'entità della compromissione della funzione secretoria è molto superiore nella SS rispetto al danno organico, e ciò ha portato ad ipotizzare che altri meccanismi siano coinvolti nella patogenesi della malattia (18). A livello del tessuto ghiandolare residuo, in particolare, alcuni autori hanno ipotizzato una disregolazione del trasporto dei fluidi, sottolineando in particolare una anomala distribuzione dei canali numero 5 dell'acquaporina nelle ghiandole salivari. Nel tessuto ghiandolare dei soggetti con SjS i canali dell'acquaporina, che regolano i movimenti dell'acqua attraverso le

membrane biologiche, sarebbero espressi non solo a livello apicale luminale ma anche a livello basolaterale determinando un ristagno interstiziale dei fluidi e contribuendo al deficit secretivo. Tale anomala distribuzione sarebbe mediata dal TNF- α e da altre citochine pro-infiammatorie prodotte localmente (19). In letteratura sono presenti dati contrastanti in questo senso; secondo altri autori, infatti, la distribuzione e la densità dell'acquaporina 5 nelle ghiandole salivari non differirebbe nei pazienti con SS rispetto ai controlli sani (20). Altri autori, negli ultimi anni, hanno indagato possibili alterazioni del circuito neurosecretorio che regola il funzionamento delle ghiandole esocrine (21). Sul parenchima ghiandolare sono presenti recettori transmembrana di tipo muscarinico, in particolare gli M3, che legano l'acetilcolina e che regolano il trasporto di ioni e di acqua attraverso le membrane cellulari nei dotti ghiandolari. Il numero dei recettori M3 eccede quello delle sinapsi neuronali ed in questo modo l'acetilcolina rilasciata da una terminazione nervosa può stimolare più acini adiacenti a quello direttamente innervato. Le alterazioni funzionali a carico del circuito neurosecretivo riguardano essenzialmente il braccio efferente del circuito, mentre quello afferente rimane integro considerando che il paziente avverte i sintomi legati alla secchezza orale e oculare. Uno dei meccanismi potenzialmente responsabili dell'iposecrezione potrebbe essere rappresentato da un ridotto rilascio di neurotrasmettitori (Ach) a livello delle giunzioni sinaptiche e/o da un'alterata risposta ai neurotrasmettitori a livello post-sinaptico. Durante il processo infiammatorio, citochine pro-infiammatorie come l'IL-1, il TNF-alfa o l'IL-6, possono interferire con il rilascio di acetilcolina da parte delle terminazioni colinergiche, inibendolo. Anche la produzione di secondi messaggeri a livello post-sinaptico è, allo stesso modo, fortemente condizionata in senso negativo dalla presenza di tali citochine, e di conseguenza le cellule ghiandolari appaiono meno responsive ai segnali efferenti (18). Infine, studi recenti hanno evidenziato un terzo meccanismo di alterazione del circuito neurosecretivo legato alla presenza di elevati livelli di anticorpi anti-M3R nei pazienti con SjS in grado di fungere da antagonisti muscarinici e di inibire la contrazione della muscolatura liscia (21). Il blocco del M3R potrebbe interferire con la secrezione ghiandolare anche contribuendo alla traslocazione dei canali dell'acquaporina (20). In conclusione la patogenesi della sindrome di Sjogren rimane ancora in larga parte da chiarire potendo essere legata sia ad un danno organico che ad un danno funzionale dei diversi parenchimi ghiandolari.

A fronte di tale complessità patogenetica il quadro clinico della sindrome di Sjogren è relativamente uniforme, essendo dominato dai sintomi legati alla secchezza delle mucose orale e oculare. Il coinvolgimento degli altri organi e apparati, seppure potenziale, si

manifesta in una minoranza dei pazienti, solitamente nelle fasi più tardive di malattia e con un'intensità clinica generalmente di tipo lieve-moderato (22). La sintomatologia oculare è caratterizzata da quadri di cheratocongiuntivite secca con ipolacrimazione, arrossamento della congiuntiva e sensazione persistente di corpo estraneo nell'occhio. Nei casi più gravi possono insorgere infezioni oculari ricorrenti e possono manifestarsi abrasioni della superficie corneale ed ulcere che possono comportare un deficit del visus (23). La sintomatologia orale è, invece, caratterizzata da una persistente xerostomia con difficoltà nella masticazione, nell'eloquio e necessità di assumere liquidi molto frequentemente. I pazienti possono riferire, inoltre, modificazioni del gusto (es. 'sensazione metallica in bocca', 'bocca amara'), tosse secca, disfagia, disagio nel portare protesi dentarie e, infine, nicturia con disturbi del ritmo sonno-veglia secondaria all'eccessiva assunzione di liquidi durante le ore diurne. Inoltre, a seconda delle casistiche, danni a carico dei processi di mineralizzazione dentaria ed alterazioni della flora microbica orale con aumento relativo dei batteri 'cariogeni' e delle diverse specie di *Candida* sono osservati fin nell'80% dei pazienti (24). All'esame obiettivo la mucosa orale appare eritematosa e asciutta e di solito si osserva la mancanza di saliva sul pavimento della bocca e/o la presenza di saliva particolarmente densa e viscosa in corrispondenza dello sbocco dei dotti delle ghiandole salivari maggiori. La superficie dorsale della lingua è spesso anch'essa arrossata e può presentare atrofia delle papille filiformi e fissurazioni laterali. In un terzo circa dei pazienti, infine, le ghiandole salivari maggiori possono presentare tumefazioni ricorrenti e bilaterali; la tumefazione delle parotidi è la più evidente ma spesso è preceduta da quella delle ghiandole sottomandibolari che, tuttavia, può essere misconosciuta (25). Nell'ambito delle manifestazioni sistemiche la malattia può potenzialmente colpire tutti gli organi e gli apparati. La tabella 2 riassume i principali quadri clinici descritti in letteratura e la loro prevalenza. La complicanza più temibile della malattia è tradizionalmente considerata l'insorgenza di una malattia linfoproliferativa e, in particolare, di un linfoma non Hodgkin a cellule B, che generalmente è un linfoma di basso grado della zona marginale. In realtà, ad oggi, studi trasversali hanno evidenziato come solo il 4% dei pazienti con SjS presenti tale complicanza ed il solo studio prospettico longitudinale che ne ha valutato l'incidenza, ha evidenziato come il 7% di pazienti con SjS abbia sviluppato tale affezione in un follow-up di cinque anni (26, 27). Tuttavia, analizzando le possibili cause di morte nei soggetti con SjS, non si evidenziano differenze statisticamente significative rispetto alla popolazione generale, se non per il rischio legato proprio alle complicanze linfoproliferative che sono responsabili di un eccesso di mortalità pari a 2.53 per 1000

persone-anno (8). Uno studio multicentrico europeo, condotto su 33 pazienti seguiti in 9 centri, ha, pertanto, recentemente cercato di mettere in evidenza le caratteristiche del subset di pazienti a rischio per linfoma, identificando nella presenza di linfadenopatia, vasculite cutanea, ipocomplementemia, coinvolgimento del sistema nervoso periferico, febbre, anemia e linfopenia potenziali fattori predittivi per una prognosi negativa (28). Fatta eccezione per le complicanze linfomatose, la SjS si presenta, invece, in conclusione, come una malattia a carattere relativamente favorevole e scarsamente aggressiva, anche se a decorso lentamente progressivo, nella quale la qualità di vita dei pazienti è condizionata essenzialmente dalla sintomatologia ghiandolare (29).

Tabella 2: Manifestazioni extraghiandolari e prevalenza

| Apparato/Organo | Quadri clinici | Prevalenza |
|------------------------|---|-------------------|
| Muscoloscheletrico | Artralgie | 60-70% |
| | Artrite | 10-20% |
| | Mialgie | 30-50% |
| Cardiovascolare | F. di Raynaud | 15%-35% |
| Respiratorio | Xerotrachea | 20%-25% |
| | Afezioni bronchiolari di tipo ostruttivo | 20%-33% |
| | Interstiziopatia polmonare (clinica e subclinica) | 8%-35% |
| Genito-urinario | Nefropatia tubulointerstiziale | 15%-20% |
| | Glomerulonefrite | 2%-5% |
| | Dispareunia | 10%-30% |
| Gastroenterico | Disfagia | 25-30% |
| | Epatopatia autoimmune | 5% |
| Cute | Vasculite cutanea | 10% |
| | Xerosi cutanea | 23%-68% |
| ORL | Ipoacusia | 27% |
| Ematologico | Anemia | 18% |
| | Leucopenia | 18% |
| | Linfopenia | 9% |
| SNP | Multinevrite sensitivo motoria | 2-10% |
| | Neuropatia autonoma | ? |
| Endocrino | Tireopatia | 30% |

Dal punto di vista dei dati di laboratorio, nella SjS, gli esami ematochimici routinari possono documentare un'ipergammaglobulinemia policlonale (80%) ed un rialzo della velocità di eritrosedimentazione in presenza di valori normali o solo modificamente alterati della proteina C reattiva (10). La SjS è caratterizzata anche da un ampio spettro di autoanticorpi non organo specifici che comprendono: anticorpi antinucleari (80%), fattore reumatoide (60-90%), anticorpi anti-Ro/SSA (60-80%) e anti-La/SSB (40-60%). La positività del fattore reumatoide si riscontra in media nel 60% dei soggetti ma una caratteristica peculiare della SjS è che, mentre nel siero è presente il fattore reumatoide di

classe IgM, nella saliva, invece, è evidenziabile un fattore reumatoide di tipo IgA, probabilmente prodotto localmente a livello ghiandolare (10). Gli anticorpi anti-Ro/SSA e anti-La/SSB sono considerati i più specifici per la SjS e fanno parte dei criteri classificativi per la malattia (7). Inoltre, gli anti-Ro/SSA sembrano correlare con l'impegno cutaneo vasculitico mentre gli anti-La/SSB con la tumefazione parotidea ed in genere con l'impegno extraghiandolare sistemico (30, 31). I bersagli antigenici degli anticorpi anti-Ro/SSA e anti-La/SSB sono costituiti da complessi ribonucleoproteici, fisiologicamente localizzati a livello citoplasmatico (70%) o intranucleare (30%). Sono descritte due proteine diverse di tipo Ro: una di 52 kDa e una di 60 kDa, mentre è nota una sola proteina di tipo La di 48 kDa. Il complesso ribonucleoproteico è costituito da RNA a basso peso molecolare (28 - 38 kDa) cui si possono fissare direttamente la proteina Ro 60 kDa (all'estremità 5') o la proteina La 48kDa (all'estremità 3'). La proteina Ro 52 kDa si fissa indirettamente all'RNA utilizzando come intermediario la Ro 60 kDa. La funzione delle molecole Ro e La rimane ancora in larga parte sconosciuta. La proteina La/SSB parteciperebbe ai fenomeni di trascrizione del DNA e nella fattispecie al complesso dell'elicasi ATP dipendente per la formazione dell'ibrido RNA/DNA; inoltre essa interverrebbe nella maturazione e nell'esportazione nel citoplasma dei trascritti dell'RNA polimerasi III. La Ro/SSA favorirebbe invece il trasporto dell'RNA dal nucleo al citoplasma. Nel nucleo la Ro 52 è fissata ad alcuni motivi del DNA e fungerebbe da regolatrice dell'espressione genica; la Ro 60, invece, inibirebbe la trascrizione operata dall'RNA polimerasi III (32). Nell'ambito dell'ampio spettro di autoanticorpi descritti un ruolo ancora controverso sembra essere svolto dagli anticorpi anti- α -fodrina. L' α -fodrina è una proteina di 240kDa che appartiene al citoscheletro cellulare e che è stata identificata in tutte le cellule, incluse quelle dei tessuti ghiandolari. Anticorpi anti- α -fodrina di classe IgG o IgA sono stati evidenziati sia nei modelli murini di SjS che nei pazienti con SjS in percentuali variabili tra il 52% e il 93%. Ad oggi, il significato clinico di questi autoanticorpi rimane ancora da chiarire anche se, poichè l' α -fodrina è associata con pompe e canali ionici di membrana, è stato ipotizzato che gli autoanticorpi anti- α -fodrina possano interferire con il funzionamento delle suddette pompe e quindi con la funzione secretoria delle ghiandole (33).

La diagnosi di SjS si basa sulla combinazione di elementi clinici, sierologici, strumentali e istologici. L'iter diagnostico prevede che la sintomatologia soggettiva del paziente relativa alla secchezza degli occhi e della bocca venga registrata mediante questionario validato

(34). Per l'obiettivazione di tale sintomatologia sono utilizzati test oculari per lo studio del film lacrimale (Test di Schirmer e Rosa Bengala) e test di valutazione morfologica e funzionale delle ghiandole salivari maggiori, quali la scialometria, la scialografia e la scintigrafia salivare. In particolare, il test di Schirmer consente di misurare la secrezione lacrimale utilizzando strisce di carta bibula poste nel fornice congiuntivale inferiore per 5 minuti. Il test è positivo se dopo 5' sono bagnati < di 5 mm della striscia di carta bibula. Il Rosa Bengala, oggi sostituito dal verde di lissamina, è, invece, un colorante specifico per cellule devitalizzate e mucina che, in presenza di un danno dell'epitelio congiuntivale o corneale, si fissa sulle cellule rendendo visibili le lesioni epiteliali (23). Dei test di valutazione delle ghiandole salivari maggiori, la scialometria consente di misurare il flusso salivare (patologico se < a 1,5 min /15 minuti), la scialografia di osservare l'architettura e la configurazione del sistema duttale e, infine, la scintigrafia permette una valutazione funzionale delle ghiandole salivari attraverso la velocità di captazione del pertecnato di sodio marcato con Tc 99m (25). Un ausilio per la diagnosi può essere fornito anche dagli esami di laboratorio ed in particolare dalla ricerca degli autoanticorpi anti-Ro/SSA e anti-La/SSB che sono gli unici inclusi nei criteri classificativi internazionali (7). Nell'algoritmo diagnostico, però, la biopsia delle ghiandole salivari minori rappresenta l'indagine "gold standard" ed è universalmente considerata come il criterio più specifico per la diagnosi di SjS (82-95%) (35). La sensibilità dell'esame è più bassa (75-83%) e la percentuale dei falsi negativi è intorno al 20% (36). L'esame viene effettuato praticando una incisione di 1,5-2 cm tra la linea mediana e la commissura della mucosa buccale del labbro inferiore. L'incisione viene effettuata su mucosa integra e le ghiandole prelevate, una volta incluse in formalina, vengono sottoposte all'attenzione del patologo (25). Allo studio istopatologico la ghiandola può mostrare un diverso grado scialoadenite (37, 38). Una scialoadenite aspecifica di grado lieve o moderato non è considerata sufficiente per la diagnosi di SjS, mentre un quadro di scialoadenite focale con almeno un cluster di 50 linfociti per 4 mm² di tessuto (focus) è compatibile con la diagnosi di malattia, anche in accordo con i criteri internazionali (7). Una distribuzione linfocitaria periduttale è inoltre considerata tipica delle forme di SjS primitivo, mentre la distribuzione perivascolare caratterizza prevalentemente le forme di SjS secondaria (38). L'esame istologico delle ghiandole salivari minori non è esente da limiti. Essi sono legati alla sua invasività, all'andamento fluttuante del grado di infiltrazione nelle ghiandole nonché alla necessità di prelevare un campione di tessuto sufficientemente grande considerando la variabilità inter-ghiandolare dell'infiltrato. Un altro limite dell'esame è la riproducibilità del risultato che è in parte

condizionata dall'area ghiandolare esaminata e dalla qualità tecnica del materiale (36). In conclusione, ad oggi non sono stati identificati biomarkers specifici per la diagnosi di SjS, in grado di permettere di formulare ipotesi prognostiche in merito al suo decorso. Anche se la malattia ha un carattere generalmente benigno, tuttavia, considerando il potenziale rischio linfoproliferativo, è auspicabile che possano essere disponibili mezzi diagnostici sempre meno invasivi e più specifici per la SjS.

Ib. SjS: Modificazioni qualitative e quantitative nella composizione della saliva

La SjS, attraverso il sovvertimento strutturale progressivo delle ghiandole salivari e le alterazioni dei processi riassorbitivi e secretivi, determina una riduzione del flusso salivare e può indurre svariate modificazioni della composizione della saliva stessa.

La valutazione quantitativa del flusso salivare viene effettuata, in accordo con i criteri classificativi internazionali, mediante scialometria basale considerando suggestivi di malattia valori uguali o inferiori a 1.5 ml/15 min (7). In realtà, un recente studio olandese ha evidenziato come la riduzione del flusso salivare sia legata, inizialmente, solo ad una riduzione del flusso delle ghiandole sottomandibolari e sottolinguali e come, solo in una fase più avanzata di malattia, si verifichi anche il coinvolgimento delle parotidi (39). In pratica vi sarebbe una progressione temporale nel coinvolgimento delle ghiandole salivari maggiori con l'interessamento, prima, delle sottomandibolari e delle sottolinguali e, dopo, delle parotidi. Lo stesso studio ha confermato come, nella storia naturale della malattia, la composizione della saliva subisca dei cambiamenti con un aumento della concentrazione assoluta del cloro e del sodio e una riduzione dei fosfati. Questi dati confermano studi biochimici precedenti che, fin da metà degli anni '80, hanno iniziato a descrivere come nella saliva dei pazienti con SjS vi fosse un aumento della concentrazione del sodio e del cloro e anche delle proteine totali, dell'albumina, delle IgG e delle IgA (40, 41). Parallelamente, però, è emerso che, anche se la concentrazione assoluta di tali soluti è aumentata, il loro output/minuto è in realtà ridotto e questo dato sarebbe quello in maggior misura responsabile delle alterazioni del cavo orale descritte in corso di malattia (42). Progressivamente, nel tempo, sono state descritte anche ulteriori modifiche a carico della lattoferrina e della beta-2-microglobulina, del lisozima, delle metalloproteinasi MMP-2 e MMP-9 e della callicreina che risulterebbero aumentate, nonché sono state osservate una riduzione nell'attività dell'amilasi e una riduzione del pH salivare (43-47). Gli studi biochimici finora condotti sulla saliva dei pazienti con SjS non sono completamente confrontabili e omogenei. Il principale limite è legato alla difficoltà nel reperire da tutti i pazienti un quantitativo di saliva sufficiente per poter studiare i diversi analiti. Per ovviare ai problemi della raccolta salivare molti studi sono stati condotti su flusso salivare stimolato o selettivamente prelevato da alcune ghiandole, generalmente le parotidi. La stimolazione consente di ovviare al limite del reperimento del campione, tuttavia, l'aumento del flusso può influenzare la concentrazione di alcune proteine che possono risultare ridotte e modificare il pH salivare, aumentandolo. La valutazione del solo flusso

parotideo, inoltre, può fornire risultati parziali in considerazione dell'apparente impegno più tardivo, da parte della malattia, delle parotidi rispetto alle sottomandibolari e alle sottolinguali (39). I parametri oggi ritenuti più sensibili (0.85) e specifici (0.96) sono la combinazione del flusso sottomandibolare e sottolinguale stimolato e la valutazione della concentrazione salivare parotidea del sodio e del cloro (48). Complessivamente, ad oggi, la scialometria e gli studi biochimici condotti sulla saliva risultano in larga parte poco confrontabili, scarsamente riproducibili e di dubbia utilità diagnostica. E' verosimile che la possibilità identificare specifici biomarkers a livello salivare, espressi in maniera diversa nei pazienti rispetto ai controlli, e negli stessi pazienti a seconda dell'attività di malattia, possa consentire di ottenere uno strumento diagnostico non invasivo di indubbia utilità nella cura della SjS; da qui il crescente interesse verso studi di proteomica volti a caratterizzare il profilo proteico della saliva dei pazienti con SjS, valutando simultaneamente un ampio numero di proteine e a partire da minime quantità di fluido salivare dell'ordine di microlitri.

Ic. La proteomica

Il termine “proteomica”, coniato in analogia con il vocabolo genomica nel 1995, indica lo studio di tutte le proteine espresse da un organismo, tessuto o cellula in un preciso istante. (49). Il proteoma è un’entità dinamica perché non solo cellule di uno stesso organismo esprimono proteine differenti, ma anche lo stesso tipo di cellula, in condizioni diverse (età, malattia, ambiente), è caratterizzato da proteine diverse (49). L’analisi diretta delle proteine, rispetto ad un approccio genomico, consente, quindi, di ottenere informazioni precise sui livelli delle proteine presenti, in quel momento, in una cellula o in un fluido biologico rilevandone, inoltre, le possibili modificazioni post-traduzionali (come ad esempio la fosforilazione), che determinano la funzione delle proteine e che risultano particolarmente importanti nella trasduzione del segnale (50, 51).

Negli ultimi anni la proteomica è progredita con crescente interesse nel mondo scientifico e, al momento, è usata come un moderno strumento nella scoperta di farmaci, per la determinazione di processi biochimici implicati nelle malattie, per monitorare processi cellulari, per caratterizzare sia i livelli di espressione che le modifiche post-traduzionali delle proteine, per ricercare differenze tra fluidi biologici o cellule di soggetti sani e malati e per identificare markers di una malattia e possibili candidati per l’intervento terapeutico (52).

Gli studi di proteomica vengono tradizionalmente distinti in tre aree: la *proteomica funzionale* che permette la caratterizzazione dell’attività, delle interazioni e della presenza di modificazioni post-traduzionali delle proteine, per la descrizione a livello molecolare dei meccanismi cellulari; la *proteomica d’espressione* che fornisce la descrizione dell’intero proteoma di una cellula, organismo o tessuto; la *proteomica strutturale* che ha l’obiettivo di identificare e mappare le proteine presenti a livello degli organuli cellulari chiarendone le interazioni reciproche (52).

Le tecnologie proteomiche, a causa della diversità delle proteine, sono le più varie e integrano metodi biologici, chimici ed analitici; la principale tecnologia utilizzata è, però, la spettrometria di massa (MS) che viene associata a metodi differenti di separazione delle proteine (53, 54). La MS è una tecnica altamente sensibile e versatile per lo studio delle proteine e la combinazione della MS, per l’identificazione proteica, con l’elettroforesi bidimensionale (2-DE), come tecnica separativa ad alto potere risolutivo, è il metodo classico e più utilizzato (52).

L'elettroforesi bidimensionale (2-DE) consente di separare, visualizzare, quantificare ed identificare centinaia di proteine a seconda del loro punto isoelettrico e peso molecolare, in un singolo gel, partendo da campioni di complesse miscele proteiche estratte da cellule, tessuti o altri campioni biologici.

La tecnica, introdotta nel 1975, separa le proteine in due step distinti (Fig.1):

1) la 1° dimensione, *Iso-Elettro Focusing (IEF)*, separa le proteine secondo il loro punto isoelettrico (pI).

2) la 2° dimensione, l'*elettroforesi su gel di poliacrilammide (SDS-PAGE)*, separa le proteine secondo il peso molecolare (PM).

Con la 2-DE si possono separare migliaia di proteine, anche quelle che differiscono per un solo amminoacido o per piccole differenze di pI e/o PM, ed ogni spot ottenuto corrisponde ad una singola specie proteica. Per una buona elettroforesi bidimensionale è essenziale un'adeguata preparazione dei campioni: il processo dovrà risultare in una completa solubilizzazione, disaggregazione, denaturazione e riduzione delle proteine del campione. Per la strategia di preparazione dei campioni è importante considerare lo scopo dello studio, infatti step addizionali possono aumentare la qualità del risultato finale, ma portano anche alla perdita di proteine (55).

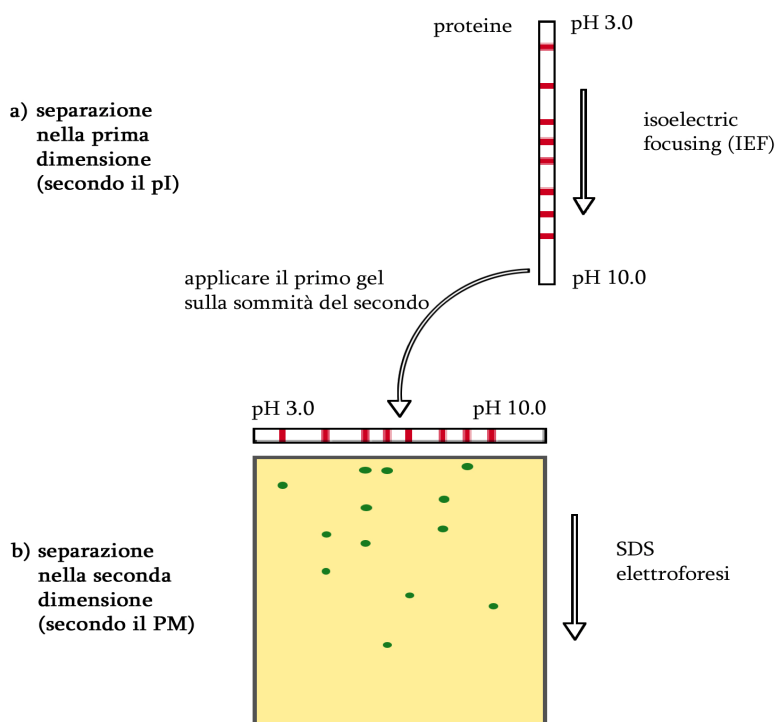


Fig. 1: Elettroforesi bidimensionale.

Prima dimensione

L'IEF è un metodo elettroforetico che separa le proteine secondo il loro punto isoelettrico (pI) utilizzando come supporti delle strip di gel di poliacrilammide. Le proteine sono molecole anfotere: presentano carica netta positiva, negativa o nulla a seconda del pH dell'ambiente in cui si trovano: sono cariche positivamente a pH minori del loro pI e negativamente a pH maggiori. Il punto isoelettrico è il valore di pH al quale la carica netta della proteina è zero. In un gradiente di pH, sotto l'influenza di un campo elettrico, le proteine si muovono fino alla posizione nel gradiente alla quale la loro carica netta è nulla; ad esempio una proteina con carica positiva migrerà verso il catodo, riducendo progressivamente la sua carica positiva, mentre si muove attraverso il gradiente, finché non raggiunge il suo pI. Questo è l'effetto focusing dell'IEF, che concentra le proteine ai loro pI e permette di separarle sulla base di piccole differenze di carica.

La risoluzione del campione è determinata dall'ampiezza del gradiente di pH e dalla forza del campo elettrico. Si utilizzano comunemente voltaggi alti (oltre 1000 V): quando le proteine hanno raggiunto la posizione finale nel gradiente di pH, nel sistema c'è un piccolo movimento ionico che risulta in una corrente finale molto bassa (sotto 1 mA).

L'IEF effettuato in condizioni denaturanti dà la più alta risoluzione ed i risultati migliori.

Originariamente il metodo prevedeva l'utilizzo di tubi di gel di poliacrilammide con gradienti generati da miscele di anfoliti, piccoli polimeri anfoteri che, sotto l'influenza di un campo elettrico, migrano e si allineano secondo i pI, dando un gradiente continuo (Klose J. 1975). A causa delle limitazioni e dei problemi di questi supporti, sono stati sviluppati dei gel a gradiente di pH immobilizzato (IPG), creati incorporando covalentemente un gradiente di gruppi acidi e basici nel gel di poliacrilammide (57). Per le strip sono utilizzate molecole ben caratterizzate, monomeri di acrilammide legati ognuno ad un singolo gruppo basico o acido. Le strip IPG sono prodotte su supporti in plastica usando due soluzioni: una miscela acida ed una basica di monomeri di acrilammide (entrambe contenenti inoltre bisacrilammide e catalizzatori). Le concentrazioni dei gruppi nelle due soluzioni determinano il range di pH del gradiente prodotto (Fig. 2). I gel sono poi lavati, disidratati e tagliati a strisce. In commercio si trovano strip (Amersham Biosciences, Sigma, etc.) di varie lunghezze (7-11-13-18-24 cm) e con vari intervalli di pH (3-10; 4-7; 6-11; 6-9; 3,5-4,5; etc), lineari (L) e non lineari (NL). L'uso delle strip IPG aumenta la riproducibilità e la qualità dei risultati (58).

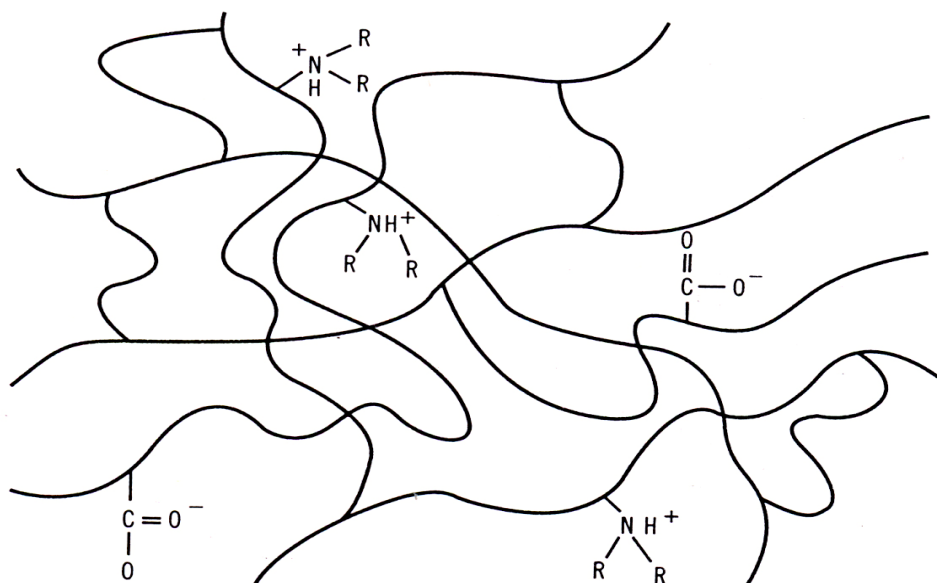


Fig. 2: Rappresentazione grafica della matrice del gel di poliacrilammide con legati i gruppi acidi e basici.

Seconda dimensione

All'IEF segue l'SDS-PAGE, una tecnica elettroforetica che separa i polipeptidi secondo la massa molecolare, utilizzando gel di poliacrilammide. Il sodio dodecil solfato (SDS) è un detergente anionico che in soluzione acquosa stabilizza le molecole proteiche denaturate formando attorno ad esse un guscio di solvatazione (1,4 g SDS/g proteine) che genera micelle dotate della stessa carica elettrica. In questo modo la specifica carica elettrica di una catena polipeptidica viene mascherata dalle cariche negative presenti sulle micelle formate dalle molecole di SDS ed ogni aggregato solubilizzato, proteina-SDS, viene a presentare identica carica negativa per unità di massa. Le particelle anioniche si spostano nel gel di acrilammide, che agisce da setaccio molecolare, separandosi in base al loro peso molecolare mentre migrano in direzione dell'anodo (55).

Per la *visualizzazione dei risultati* possono essere utilizzati molti metodi e le caratteristiche richieste sono: alta sensibilità, ampio range di quantificazione, compatibilità con la spettrometria di massa, bassa tossicità. I metodi più comunemente utilizzati sono il SILVER STAINING o colorazione argentea che è un processo multi-step a vari reagenti molto sensibile (1 ng) o il COOMASSIE STAINING (55). Questo ultimo è circa 50-100 volte meno sensibile (30-50 ng) della colorazione all'argento ma è il solo compatibile con la successiva MS (59).

Le immagini dei gel vengono poi acquisite tramite scanner ed analizzate al computer con software appositi per analizzare complessi campioni proteici separati con l'elettroforesi bidimensionale: un esempio è il software Amersham Biosciences ImageMaster TM 2D Platinum Elite. E' così possibile individuare proteine mancanti o modificate, quantificare gli spot proteici e valutare i cambiamenti nell'espressione proteica in diversi campioni (come controlli vs patologici) (60).

Gli spots proteici di interesse possono essere ulteriormente caratterizzati mediante **spettrometria di massa (MS)**. Uno spettrometro di massa è uno strumento analitico in grado di misurare la massa molecolare di una molecola dopo che essa sia stata ionizzata, ossia dopo che gli sia stata impartita una carica elettrica. Esso è infatti in grado di separare gli ioni molecolari in base al loro rapporto massa/carica. La formazione di ioni di campione in fase gassosa è un prerequisito essenziale per i processi di separazione e di rivelazione tipici di uno spettrometro di massa (61, 62). Esistono molte sorgenti di ionizzazione, ma le più usate nel campo dei peptidi e delle proteine sono la sorgente **MALDI** (matrix-assisted laser desorption/ionization), SELDI (surface enhanced laser desorption/ionization) e la sorgente ESI (elettrospray ionization) (63). La sorgente MALDI, la cui messa a punto risale alla fine degli anni '80, rappresenta una tecnica di ionizzazione "soft" e quindi applicabile a molecole grandi, non volatili o termicamente poco stabili. La tecnica di ionizzazione del MALDI è detta per desorbimento ed è un processo in cui una molecola viene sia evaporata da una superficie che ionizzata. Il campione viene miscelato ad una matrice (di solito acidi organici non volatili, in modo da ottenere un rapporto matrice/campione pari a 10.000:1) e posto, quindi, su un supporto di acciaio dove viene lasciato cristallizzare. La superficie del campione viene bombardata con fotoni ad alta energia derivanti da un raggio laser pulsato (λ 337 nm). L'impatto deposita energia sul campione, direttamente o mediante la matrice, e porta al trasferimento delle molecole campione in fase gassosa ed alla loro ionizzazione. Nel MALDI si assiste ad una ionizzazione per protonazione ossia le molecole catturano protoni caricandosi positivamente (fig 3) (63). La tecnica SELDI, utilizzata a partire dagli anni '90, consente di separare gli analiti in base alla carica di superficie ed è particolarmente utile nell'identificare ioni di bassa massa e di carica basica. Nella ionizzazione per elettro-nebulizzazione (ESI), infine, gli ioni si formano da soluzioni che vengono finemente nebulizzate attraverso un capillare tenuto ad alto potenziale elettrico. Gli ioni dell'analita, nelle goccioline cariche, vengono volatilizzati in seguito alla rimozione del solvente per

evaporazione e diretti, attraverso un sistema di trasferimento ionico, all'analizzatore di massa (64).

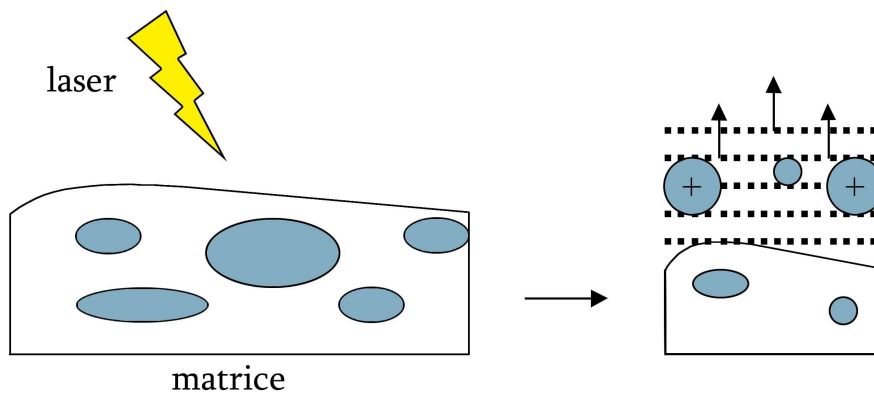


Fig. 3 : MALDI

Una volta ionizzate, le molecole vengono identificate in base al rapporto massa/carica. Il tipo di analizzatore di massa che viene maggiormente usato per l'approccio proteomico classico è il **TOF** (time of flight). Il TOF è essenzialmente costituito da un tubo di lunghezza l nota dove vi è assenza di campo elettrico, ma un'elevata condizione di vuoto. Il vuoto è necessario per permettere agli ioni di raggiungere il detector senza collidere con altre molecole gassose. Queste collisioni potrebbero ridurre la risoluzione e la sensibilità dello strumento e provocare frammentazioni degli stessi ioni. Nel MALDI-TOF un impulso laser desorbe e ionizza le biomolecole. Gli ioni vengono accelerati tramite un voltaggio elevato, acquisendo una velocità che dipende dalla massa: gli ioni leggeri acquisiscono una velocità più elevata rispetto a quelli più pesanti. Entrando in una regione priva di campo elettrico ogni ione mantiene una velocità costante fino a che non raggiunge il rivelatore. Gli ioni di massa differente possono quindi essere separati secondo il tempo: gli ioni più pesanti impiegano più tempo di quelli leggeri. Rilevando il numero degli ioni che arrivano a tempi diversi, è possibile calcolare e visualizzare uno spettro di massa del campione nel quale sono presenti picchi diversi che rappresentano la composizione in ioni con un diverso rapporto massa/carica. Poiché lo stato di carica è solitamente di +1, negli esperimenti di MALDI, è possibile identificare i picchi come rappresentativi delle masse (Fig 4).

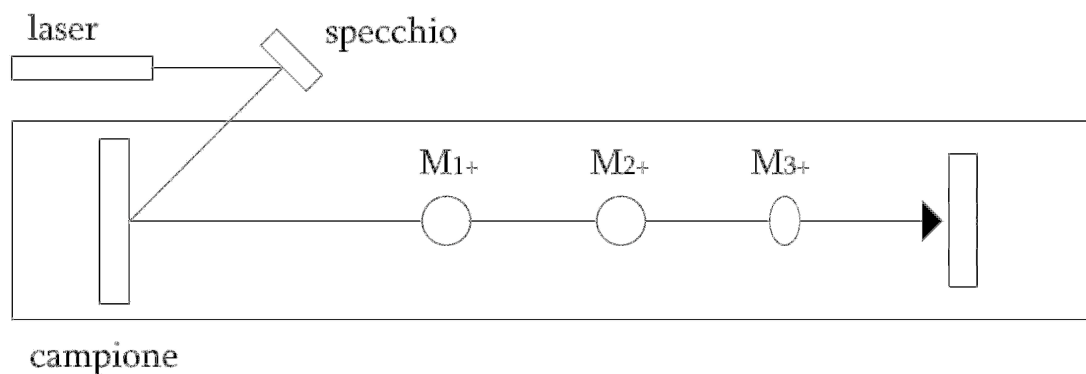


Fig. 4: MALDI-TOF

La MS crea una lista di massa dai peptidi analizzati. Tale lista di massa dei peptidi sconosciuti viene comparata con un database, costituito da proteine note. Comparando la lista di massa dei peptidi della proteina sconosciuta con le liste di massa dei peptidi noti presenti nel database viene effettuata l'identificazione (64) La quantità minima di campione necessaria per l'analisi dipende dalla purezza del campione e di solito è nell'ordine di poche picomoli.

Il vasto range di massa letto, tra 1 e 300 kDa, l'alta accuratezza e la sensibilità rendono il MALDI un metodo d'elezione per l'analisi di tutti i tipi di biomolecole (proteine, acidi nucleici, carboidrati) (65).

In combinazione con l'elettroforesi bidimensionale (e con i database di proteine) il MALDI è particolarmente utilizzato per l'identificazione di spot proteici attraverso 2 approcci principali: la *peptide-mass fingerprinting* (analisi della massa dei digeriti proteolitici) o la *peptide sequencing* (66).

I campioni, di solito, sono separati su un gel e gli spot proteici di interesse sono tagliati e trattati con tripsina, un enzima in grado di rompere i legami peptidici in cui è coinvolto un residuo di arginina o lisina; la miscela di frammenti proteici (peptidi) ottenuta dopo digestione enzimatica è purificata e sottoposta ad analisi di massa. La massa dei peptidi può essere misurata con maggior precisione rispetto a quella delle proteine intatte: i peptidi danno origine ad una library di masse molecolari derivate direttamente dalle proteine, che possono essere identificate con tecniche computazionali e tramite l'utilizzo di database (67). Se la proteina non risulta presente nei database, è possibile ottenere informazioni sulla sequenza dal MALDI con un protocollo di degradazione di Edman modificato: questo è un metodo comune per l'analisi della sequenza delle proteine, che utilizza ripetuti cicli di

rottura dei singoli amminoacidi dal terminale amminico (tramite peptidasi) e successiva identificazione degli amminoacidi staccati con cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC). La miscela di peptidi è analizzata e la sequenza codificata tramite differenze di massa (peptide ladder sequencing) (Fig. 5).

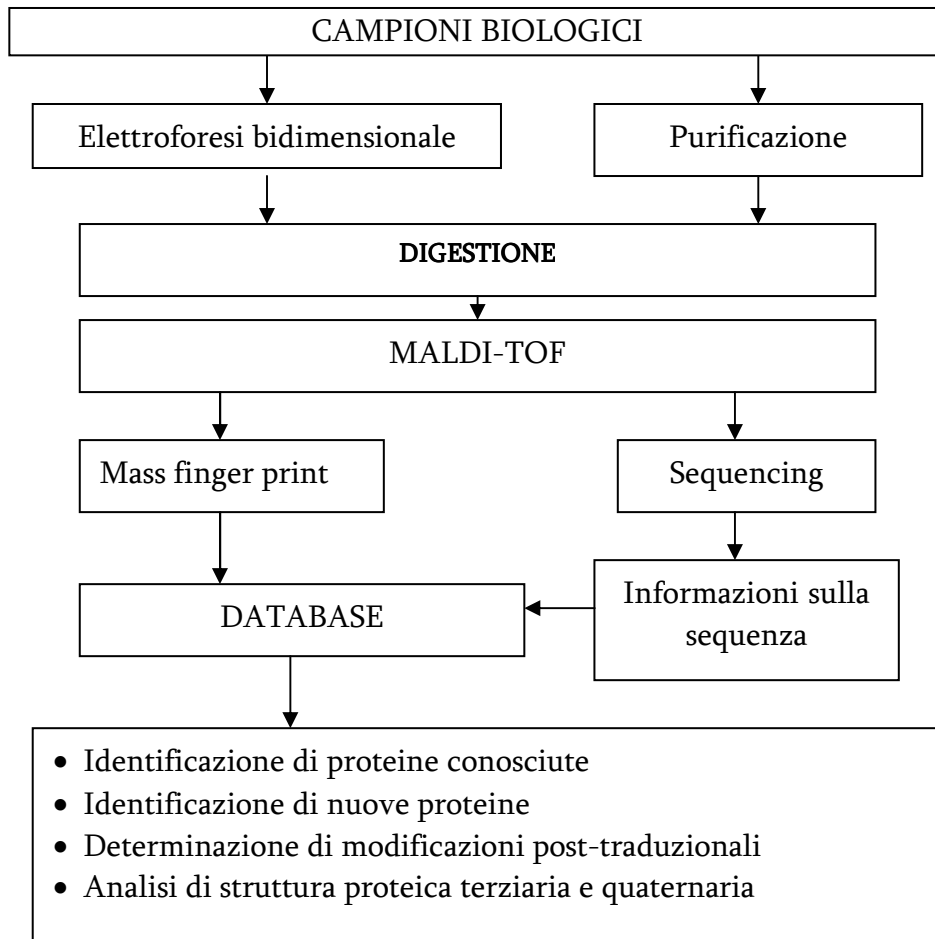


Fig. 5: Schema per l'identificazione di proteine.

Id. Applicazioni cliniche dell'analisi proteomica allo studio della saliva

La saliva in condizioni fisiologiche svolge alcune funzioni fondamentali come: lubrificare e pulire i tessuti orali facilitando il linguaggio, la deglutizione e l'ingestione di cibi; mantenere l'omeostasi nella cavità orale attraverso i tamponi carbonato e fosfato; rimineralizzare i denti con calcio e fosfato; proteggere la superficie dei denti e delle mucose attraverso un'importante azione antimicrobica (lisozima, cistatine, immunoglobuline, lactoferrina, istatine); iniziare la digestione degli amidi grazie all'amilasi salivare (68). La saliva è costituita per il 90% dai fluidi secreti dalle ghiandole salivari maggiori (parotidi, sottomandibolari, sottolinguali) e minori (si trovano nel labbro inferiore, lingua, palato, guance e faringe) e per un 10% è rappresentata dal fluido gengivale crevicolare. La sua composizione è caratterizzata principalmente da acqua (99%), elettroliti ma anche proteine di varia natura (enzimi, mucine, immunoglobuline) (68).

L'analisi della saliva, rispetto ad altri fluidi biologici, offre alcuni vantaggi come il fatto che possa essere raccolta in modo non invasivo da personale con preparazione limitata e senza particolari attrezzature, facilmente anche da pazienti meno collaboranti (bambini, anziani, insufficienti mentali) e che possa fornire un approccio poco costoso per lo screening di grandi popolazioni. I limiti dell'analisi salivare sono, viceversa, rappresentati dall'alta concentrazione di mucine, di residui e di batteri nonché dalla sua alta attività proteolitica (69). La raccolta di saliva direttamente dalle ghiandole che la producono può essere utile per individuare patologie specifiche delle ghiandole, ma oggi, sempre più frequentemente, nella diagnosi delle malattie sistemiche, è la saliva presente nel cavo orale che viene più frequentemente utilizzata; tale utilizzo è in larga parte giustificato dal fatto che la saliva del cavo orale contiene alcuni costituenti del siero che raggiungono le ghiandole salivari per diffusione passiva, per ultrafiltrazione attraverso le giunzioni intracellulari o attraverso il flusso del fluido gengivale (70). Certamente i livelli di certi costituenti serici nella saliva non sono sempre un riflesso dei livelli di questi markers nel siero, ma c'è un crescente interesse nell'uso della saliva e soprattutto nello studio delle proteine salivari per scopi diagnostici, specie nel caso di malattie sistemiche ereditarie, autoimmuni, infettive, nelle neoplasie del cavo orale e per le malattie virali, nonché anche per monitorare i livelli di farmaci, sostanze d'abuso ed ormoni (70, 71). In questo senso, è stato ipotizzato che nella fibrosi cistica, ad esempio, l'antigene carcinoembrionario o la glicosilazione di alcune mucine salivari possano fungere da biomarkers di malattia mentre,

nei pazienti con diabete mellito, la concentrazione salivare di amilasi e IgA salivari risultino aumentate (72).

Negli ultimi cinque anni la ricerca dei biomarkers salivari di malattia è stata potenziata grazie alla tecnologia proteomica che ha permesso di mappare le proteine presenti nella saliva dei soggetti sani analizzando sia il fluido salivare in toto (69, 72-74) che la pellicola salivare adesa ai denti (75), il fluido creviculare (76) e, infine, anche i secreti ghiandolari selettivamente prelevati dalle parotidi, dalle sottomandibolari e dalle sottolinguali (77,78). Il confronto tra il pattern proteico salivare dei soggetti sani e dei malati sta consentendo di rilevare livelli di proteine specifiche che potrebbero essere usati come biomarkers di malattia. E' possibile ipotizzare, con tale approccio, di poter fornire anche informazioni riguardo variazioni semiquantitative sui livelli specifici di ciascuna proteina e rilevare la presenza di isoforme dovute a modificazioni post-traduzionali come fosforilazioni e glicosilazioni. Analisi in questo senso sono già state effettuate per il lichen planus, per alcune neoplasie del cavo orale e della testa e sono in corso per numerose malattie sistemiche (79, 80). Un lavoro preliminare è stato recentemente pubblicato anche per la SjS ma limitatamente all'analisi del secreto parotideo stimolato (81). Questo lavoro, che si colloca nel più ampio panorama delle recenti applicazioni della proteomica allo studio delle malattie reumatiche (Tabella 3), ha messo in luce importanti differenze qualitative e quantitative nei pazienti con SjS evidenziando, in particolare, la riduzione dell'amilasi e della carbonato deidrogenasi e l'aumento dei livelli di alcune proteine come la beta-2-microglobulina, il lisozima C, la cistatina C, la catena immunoglobulinica leggera Igk e il recettore polimerico delle IgG. Alla luce dei risultati incoraggianti finora ottenuti, lo studio delle proteine salivari sembra poter aprire nuovi sbocchi e nuove potenzialità per la ricerca sulle malattie reumatiche, specie nel caso di malattie come la SjS che colpiscono elettivamente le ghiandole salivari.

Tabella 3: *Analisi Proteomica in Reumatologia*

| Malattia | Autore | Materiali |
|---|--------------------------------|---------------------------|
| Osteoartrite | Hermansson M. et al. 2004 (82) | Cartilagine patologica |
| Osteoartrite | De Ceuninck F et al. 2005 (83) | Cartilagine patologica |
| Osteoartrite | Ruiz-Romero C et al. 2005 (84) | Cartilagine patologica |
| Artrite Reumatoide | Sinz A. et al. 2002 (85) | Siero, liquido sinoviale |
| Artrite Reumatoide | Liao H. et al. 2004 (86) | Siero, liquido sinoviale |
| Artrite Reumatoide | Drynda S et al. 2004 (87) | Siero, liquido sinoviale |
| Artrite Reumatoide | de Seny D et al. 2005 (88) | Siero |
| Artrite Reumatoide | An Y et al. 2005 (89) | Siero |
| Artrite Reumatoide, Spondiloartrite, Osteoartrite | Tilleman K et al. 2005 (90) | Sinovia |
| Artrite cronica giovanile | Miyamae T et al. 2005 (91) | Siero |
| Sindrome di Sjogren | Tomosugi N. et al. 2005 (92) | Lacrime |
| Sindrome di Sjogren | Ryu O. et al. 2006 (81) | Saliva (flusso parotideo) |
| Granulomatosi di Wegener | Stone JH. et al. 2005 (93) | Siero |
| Sclerodermia | Fietta A. et al. 2006 (94) | Liquido broncoalveolare |

II. SCOPO DEL LAVORO

Lo scopo di questa tesi è stato quello di caratterizzare il pattern proteico della saliva di pazienti con SjS primitiva utilizzando la tecnologia proteomica. Per lo studio è stato scelto di analizzare il proteoma salivare, inteso come il completo set di proteine presenti nella cavità orale in un dato momento, combinando l'elettroforesi bidimensionale con la spettrometria di massa MALDI-TOF. La scelta della saliva è stata effettuata in relazione al caratteristico impegno clinico delle ghiandole salivari nella SjS, e considerando anche il crescente interesse per la saliva come strumento diagnostico in molte malattie sistemiche; essa, infatti, si configura come un fluido biologico più facilmente reperibile rispetto al siero e con una minore complessità in termini di numero di proteine e variabilità.

I risultati ottenuti sono stati confrontati, in primis, con soggetti sani che presentassero caratteristiche comparabili per sesso e per età.

Successivamente, la popolazione di controllo è stata allargata ad un gruppo di controllo "patologico" eterogeneo con finalità comparative diverse. Sono stati inclusi, allora, nello studio soggetti con xerostomia idiopatica, non affetti da SjS, allo scopo di valutare quali modificazioni del profilo proteico potessero rispecchiare più da vicino le modificazioni del cavo orale imputabili alla secchezza della mucosa orale di per sé. Sono poi stati studiati pazienti con profilo auto-anticorpale analogo ai soggetti con SjS e, nella fattispecie con anticorpi anti-Ro/SSA e anticorpi anti-Ro/SSA + anti-La/SSB, ma non affetti da xerostomia, allo scopo di valutare se esistessero eventuali correlazioni tra il profilo auto-anticorpale e le modificazioni nei livelli di proteine espresse. Infine, sono stati considerati pazienti affetti da un'altra malattia immunomediata capace di coinvolgere, anche se con meccanismi diversi, le ghiandole salivari: la Sclerodermia. La Sclerodermia è una connettivite sistemica, a patogenesi autoimmune, caratterizzata da una progressiva fibrosi che coinvolge la cute e gli organi interni (polmone, tratto gastroenterico, rene, cuore) (95). La malattia è provocata da una incontrollata proliferazione del tessuto connettivo e della matrice extracellulare ad opera dei fibroblasti cui si associano alterazioni vascolari localizzate soprattutto a livello del circolo arterioso più periferico (96, 97). Nella storia naturale della malattia è descritto un potenziale coinvolgimento delle ghiandole salivari di tipo fibrotico direttamente legato alla malattia. L'analisi di tipo istopatologico delle ghiandole salivari di pazienti con Sclerodermia ha, infatti, documentato un aumento del numero delle mast-cellule tissutali nonché un incremento nell'espressione delle isoforme del TGFβ2 e β3 a livello dei fibroblasti ghiandolari; elementi cellulari entrambi coinvolti nei

processi fibrotici (98). Poiché la Sclerodermia può, tuttavia, presentarsi in associazione alla SjS (95) ed è possibile, in questo caso, che i pazienti presentino un coinvolgimento delle ghiandole salivari legato alla sindrome di Sjogren secondaria, nello studio questo ultimo gruppo di pazienti è stato escluso. In conclusione, il gruppo di controllo patologico è risultato costituito da:

- a. soggetti con xerostomia idiopatica
- b. soggetti affetti da Sclerodermia
- c. soggetti asintomatici con anti-Ro/SSA
- d. soggetti asintomatici con anti-Ro/SSA e anti-La/SSB

Il confronto dei patterns proteici tra i diversi subset di soggetti arruolati nello studio ha avuto come obiettivo principale quello di evidenziare le alterazioni qualitative e quantitative peculiari solo dei pazienti con diagnosi di SjS primitiva, nel tentativo di isolare biomarkers specifici di malattia che avessero una potenziale valenza diagnostica per la SjS primitiva. Nell'ambito degli obiettivi secondari si è cercato di giustificare tali alterazioni alla luce delle più recenti acquisizioni eziopatogenetiche e cliniche disponibili per la malattia.

III. MATERIALI E METODI

IIIa. Pazienti

Nello studio sono stati arruolati 15 pazienti di sesso femminile ed età media $49,38 \pm 12,54$ ($M \pm DS$), affette da SjS primitiva e seguite presso l'U.O di Reumatologia dell'Università di Pisa. La diagnosi è stata formulata, nella totalità dei casi, in accordo con i più recenti Criteri Americani ed Europei per la malattia (7). La sintomatologia soggettiva dei pazienti, relativa alla secchezza oculare e all'impegno delle ghiandole salivari, è stata raccolta mediante apposito questionario validato. Per l'obiettivazione della secchezza oculare sono stati eseguiti nella totalità dei casi test di Schirmer e Rosa Bengala (o verde di lissamina) ed in tutti i casi sono stati determinati il profilo bio-umorale (comprensivo dell'elettroforesi proteica) e la ricerca degli autoanticorpi non organo specifici. In particolare, la ricerca degli anticorpi antinucleari, degli anti-Ro/SSA e anti-La/SSB e del fattore reumatoide è stata effettuata, rispettivamente, mediante immunofluorescenza su Hep2, contro-immunoelettroforesi e nefelometria. Infine, i soggetti sono stati sottoposti a biopsia delle ghiandole salivari minori la cui lettura è stata effettuata secondo il grading di Chisolm e Mason (99). Le caratteristiche cliniche e sierologiche delle pazienti sono riassunte nella tabella 4. In tutti i pazienti è stata esclusa un'infezione da virus HBV and HCV, virus scialotropi in grado di determinare una flogosi ghiandolare.

Il gruppo di controllo di soggetti sani è risultato costituito da 15 soggetti sani comparabili per sesso e per età con i pazienti arruolati ($45,83 \pm 17,38$; $M \pm DS$). Lo studio è poi stato allargato a 6 soggetti con sindrome secca idiopatica ($65,16 \pm 6,24$; $M \pm DS$), 6 pazienti con anticorpi anti-Ro/SSA ($38,4 \pm 9,45$; $M \pm DS$), 3 con anti-Ro/SSA ed anti-La SSB positivi senza sindrome secca ($42,33 \pm 7,63$; $M \pm DS$) e 15 pazienti con Sclerodermia diffusa e profilo autoanticorpale omogeneo positivo per anti-Scl 70 (età media $49,5 \pm 10$) ($M \pm DS$). La definizione di sindrome secca idiopatica è stata attribuita a soggetti con xerostomia apparentemente non attribuibile alle più comuni cause virologiche o farmacologiche, con profilo auto-anticorpale negativo e biopsia delle ghiandole salivari con grading di Chisolm Mason ≤ 2 . Nei soggetti asintomatici carrier di autoanticorpi la positività degli autoanticorpi anti Ro/SSA e anti La/SSB è stata confermata in almeno due successive determinazioni. La diagnosi di Sclerodermia, infine, è stata definita in accordo con i criteri classificativi internazionali (100). Sono stati esclusi dallo studio soggetti fumatori. Per l'inclusione nello studio tutti i partecipanti hanno rilasciato un consenso informato.

Tabella 4. *Caratteristiche clinico-sierologiche dei pazienti con SjS in studio*

| Caratteristica | Percentuale |
|---|--------------------|
| Xerostomia | 100% |
| Xeroftalmia | 100% |
| Test oculari (Schirmer o Rosa Bengala) | 100% |
| Uso quotidiano lacrime artificiali | 100% |
| Sensazione di sabbia negli occhi | 75% |
| Necessità di bere frequentemente nella giornata | 50% |
| Tumefazione ghiandole salivari maggiori | 15% |
| Biopsia ghiandole salivari positiva | 80% |
| FAN Hep2>1:160 | 85% |
| Anti-Ro/SSA | 75% |
| Anti-La/SSB | 25% |
| Ra test | 60% |
| Ipergammaglobulinemia | 80% |

IIIb. Materiali e Strumentazione

L'acqua, di grado analitico, è stata filtrata mediante l'apparecchio MilliQ (PS Whatman®, Millipore Corporation, Maid Stone, England).

Tutti i reagenti e i solventi sono stati acquistati dalle più comuni fonti commerciali.

Sono state utilizzate strip Immobiline™ DryStrip pH 3-10 L, di 18 cm, e le Ettan™ IPGphor™ Strip Holder, in ceramica, dell'Amersham Biosciences (Uppsala, Sweden).

L'apparecchio impiegato per l'isoelettrofocalizzazione è stato l'Ettan™ IPGphor™ Isoelectric Focusing System (Amersham Bioscience). Per fare i gel è stato utilizzato il Protean Plus Multicasting Chamber (Biorad).

L'apparecchio per l'elettroforesi usato è il Protean II XL Ready Gel (Biorad) con alimentatore EPS 601 Power Sully (Amersham Bioscience).

IIIc. Raccolta e preparazione del campione

I campioni di saliva dei soggetti sono raccolti tramite sputo, senza stimolazione chimica, al mattino e a digiuno. Per minimizzare la degradazione proteica, i campioni sono stati mantenuti in ghiaccio e trattati immediatamente. Da ogni soggetto sono stati ottenuti 1-2,5 ml di saliva che sono stati centrifugati a 14000 g per 20 minuti a 4°C per rimuovere materiale insolubile e cellule.

Nella preparazione il campione di saliva (già centrifugato per eliminare il materiale insolubile) viene addizionato ad acido tricloroacetico (TCA) al 20% e ditiotreitolo (DTT) allo 0,1% (1 ml di TCA per 1 ml di saliva: concentrazioni finali TCA 10% e DTT 0,05%) e le proteine vengono lasciate precipitare in ghiaccio per 30 minuti. Al termine del periodo di incubazione la sospensione è centrifugata a 14000 g per 10 minuti a 4°C. Il sovrantante viene eliminato, mentre il pellet ottenuto è risospeso con ultraturax in 2 ml di acetone a 4°C, quindi centrifugato a 14000 g per 15 minuti. Questa operazione di lavaggio con acetone freddo viene ripetuta altre due volte al fine di eliminare il TCA. Gli eventuali residui di acetone sono eliminati tramite evaporazione ed il pellet finale, che contiene le proteine presenti nella saliva, viene processato per effettuare la prima dimensione. Il pellet proteico è risospeso nella soluzione di reidratazione. La soluzione di reidratazione utilizzata è composta da:

Urea 7M – Thiourea 2M: servono per solubilizzare e denaturare le proteine così che siano presenti in una sola configurazione;

Chaps 4%: è un detergente non ionico che permette di solubilizzare le proteine idrofobiche e minimizzare l'aggregazione proteica;

Ditiotreitolo (DTT) 60mM: agente riducente, serve per rompere ogni ponte disolfuro e permettere alle proteine di distendersi completamente;

Blu di Bromofenolo 0,002%: per seguire la corsa, se il tracciante non migra all'anodo non c'è flusso di corrente;

Anfoliti (3-10) 0,5%: aumentano la solubilità delle proteine minimizzando la loro aggregazione dovuta ad interazioni carica-carica.

I campioni devono rimanere in tale soluzione 30 minuti, a temperatura ambiente, per ottenere una completa denaturazione e solubilizzazione. Una piccola aliquota del campione viene utilizzata per la determinazione della concentrazione proteica tramite il metodo RC/DC della Biorad (Peterson GL.), il volume restante viene utilizzato per la prima dimensione. Per i gel analitici le aliquote contengono 150 µg di proteine e vengono portate sino ad un volume finale di 350 µl con la soluzione di reidratazione. A questo punto i campioni possono essere utilizzati per la prima dimensione o congelati a -80°C ma in tal caso gli anfoliti sono omessi e vengono addizionati solo al momento della prima dimensione.

Dosaggio proteico RC/DC/BIORAD

Il DC protein assay è un dosaggio colorimetrico con cui viene costruita una curva di riferimento utilizzando una proteina standard che dovrà essere preparata nello stesso tampone del campione proteico di interesse. In questo caso la proteina standard albumina bovina, è risospesa nella soluzione di reidratazione. Vengono preparate quattro concentrazioni (con un volume di 25 µl) di proteina standard (0.2-0.4-0.8-1.5 mg/ml) che abbracciano l'intervallo di sensibilità del metodo (Tab.5).

Tabella 5. *Diluizioni della BSA per la retta di taratura.*

| | Rehydration | BSA | Concentrazione | µg BSA |
|--------|-------------|---------|----------------|--------|
| Bianco | 25µl | - | 0 µg/µl | 0 µg |
| 1 | 21,7µl | 3,3µl | 0,2 µg/µl | 4 µg |
| 2 | 18,3µl | 6,7µl | 0,4 µg/µl | 8 µg |
| 3 | 11,7 µl | 13,3 µl | 0,8 µg/µl | 16 µg |
| 4 | - | 25 µl | 1,5 µg/µl | 30 µg |

Per il dosaggio proteico del campione incognito si procede con una diluizione 1:10 o 1:5 dello stesso (si valuta sulla base del volume di soluzione scelto per la risospensione del campione) con la soluzione di reidratazione per avere un volume finale di 25 μ l.

Il dosaggio viene effettuato in eppendorfs, in doppio; come bianco viene dosata la soluzione di reidratazione, a temperatura ambiente.

Agli standars ed ai campioni così preparati sono aggiunti 125 μ l di reagente I, agitati su vortex, e incubati 1 minuto. Quindi vengono addizionati 125 μ l di reagente II, agitati su vortex e centrifugati a 12000 g per 5 minuti. I sovrantanti sono scartati, e questo primo step è ripetuto variando i volumi di reagente I (125 μ l) e II (40 μ l). Sono quindi addizionati 127 μ l di reagente A* per ciascuna eppendorf, agitato e incubato per 5 min o finchè il precipitato non è completamente disciolto. Si addiziona infine 1 ml di reagente B in ciascuna eppendorf agitando immediatamente e si lascia in incubazione per 15 minuti. Al termine del periodo di incubazione si procede alla lettura dei campioni alla lunghezza d'onda di 750 nm.

Si costruisce una retta di taratura nell'intervallo di sensibilità da 5 μ g a 37.5 μ g: $y=Ax$, e dall'equazione della retta si procede al calcolo della concentrazione proteica per il campione incognito.

$$\frac{(\text{lettura campione} - \text{lettura bianco})}{\text{assorbanza}} \times \text{fattore diluizione} = \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$$

IIIId. Elettroforesi Bidimensionale

Isoelettrofocalizzazione

La prima dimensione è effettuata su strip di 18 cm in cui è presente un gradiente lineare di pH 3-10 (Amersham Biosciences).

-Il volume caricabile su una strip da 18 cm è di 350 μ l.

-Il volume del campione deve essere < al 25% del volume totale.

-Al momento vengono aggiunti 0,5% di anfoliti.

Si caricano su strip holder i 350 μ l del campione (pari a 150 μ g di proteine); si pone sopra l'IPG strip e si copre con l'IPG Cover Fluid (Amersham Biosciences), un olio minerale che minimizza l'evaporazione e la cristallizzazione dell'urea, prima di chiudere con l'apposito coperchietto.

Per la prima dimensione è utilizzato l'Apparecchio IPGphor (Amersham Biosciences) che permette di impostare reidratazione e IEF del campione contemporaneamente (Tabella 6). Il programma utilizzato come tempi e voltaggio applicati è sotto elencato e arriva a permettere di ottenere fino ad ottenere 70000 V totali:

Tabella 6. *Ettan IPGphor Isoelectric Focusing System.*

| | | | |
|---------------|-----|-------|------|
| reidratazione | 1h | 0V | 16°C |
| I step | 10h | 30V | 16°C |
| II step | 1h | 200V | 16°C |
| III step | 30' | 300V | 16°C |
| IV step | 3h | 3500V | 16°C |
| V step | 10' | 5000V | 16°C |
| Vi step | 12h | 8000V | 16°C |

Gli alti voltaggi raggiunti richiedono un controllo della temperatura che infatti è mantenuta a 16°C per tutta la corsa. Inoltre, dopo la reidratazione delle strip, vengono inseriti sugli elettrodi dei quadratini di una apposita carta per isoelettrofocusing (electrode pads). Tali pads vengono inumiditi con acqua MilliQ e posti tra la strip e gli elettrodi per preservare questi ultimi dalla precipitazione degli ioni.

Al termine della IEF la strip viene ripulita dall'eccesso di olio minerale e utilizzata subito per la seconda dimensione o conservata a -20 °C.

Equilibratura

Prima di effettuare la seconda dimensione la strip viene equilibrata incubandola, in successione, con:

- 1) 10 ml di SDS Equilibration Buffer + DTT 1% per 15 minuti in agitazione a temperatura ambiente;
- 2) 10 ml di SDS Equilibration Buffer + IAA 2,5% per 15 minuti in agitazione a temperatura ambiente;

L' SDS equilibration buffer contiene:

Tampone equilibrante (Tris-HCl 50 mM pH 8,8): per mantenere le strip in un range di pH appropriato per l'elettroforesi;

Urea (6 M) *Glicerolo* (30%): per ridurre l'elettroosmosi e migliorare il trasferimento delle proteine alla seconda dimensione. L'elettroosmosi è dovuta alla presenza di cariche fisse sulla strip all'interno di un campo elettrico e può interferire con il trasferimento delle proteine dalla strip al gel della seconda dimensione;

Sodio dodecil solfato (2%): denatura le proteine e forma complessi proteine-SDS carichi negativamente. La quantità di SDS legato ad una proteina, e quindi la carica negativa, è direttamente proporzionale alla massa della proteina, in questo modo l'elettroforesi separerà le proteine in base al loro peso molecolare;

Blu di Bromofenolo (0,002%): usato come agente tracciante per seguire la corsa elettroforetica;

Ditiotreitolo (1%): agente riducente per preservare lo stato ridotto delle proteine;

Iodoacetammide (2,5%; al 2° lavaggio): per alchilare i gruppi tiolici delle proteine e prevenirne la riossidazione durante l'elettroforesi.

Seconda Dimensione

La strip viene posta sopra un gel di poliacrilammide 12% (20cm×20cm×1,5mm), facendo bene attenzione che aderisca in tutta la sua lunghezza al gel, e bloccata con una soluzione di agarosio 0.1% in Running Buffer.

L'elettroforesi è effettuata in due step: per i primi 15 minuti si impostano 15 mA per gel aumentando poi la corrente a 40 mA per gel finché il fronte del campione, visualizzato tramite il Blu di bromofenolo, esce dal fondo di corsa (circa 5:30 ore).

Per la corsa elettroforetica si utilizza il RUNNING BUFFER 10X (Tris-base 25mM, Glicina 192 mM, SDS 0.1%) diluito 1:10; la diluizione viene fatta il giorno precedente per mantenere il tampone a 4°C e poterlo utilizzare freddo.

Preparazione Del Gel 12% Nel Multicasting

Al fine di minimizzare la variabilità sperimentale e quindi aumentare la riproducibilità, i gel di acrilammide (12%) vengono preparati contemporaneamente (fino ad 8 gel-Tabella 7) utilizzando l'apparecchio Multicasting della Biorad e la corsa è condotta su di un apparecchio Protean II XI Multi-cell 2D in grado di ospitare e far correre contemporaneamente fino a 6 gel in condizioni termostate (circa 10°C).

Tabella 7. Volumi per 6 ed 8 gel di acrilammide al 12%.

| | 6 gel | 8 gel |
|---------------------------------|----------|----------|
| H ₂ O milliQ | 142.8 ml | 190.4 ml |
| Tampone Tris 1.5M pH8.8 | 105 ml | 140 ml |
| Acrilammide/bis-acrilammide 30% | 168 ml | 224 ml |
| Ammonio persolfato 10% | 2.1 ml | 2.8 ml |
| Temed | 105 µl | 140 µl |

Colorazione dei gel

I gel bidimensionali così ottenuti sono stati colorati utilizzando una colorazione all'argento/ammoniaca.

Alla fine della seconda dimensione, il gel viene rimosso dai vetri ed è lavato con acqua deionizzata per 5 min, quindi lasciato in etanolo:acido acetico:acqua (40:10:50) per un'ora, e successivamente in etanolo:acido acetico:acqua (5:5:90) per tutta la notte. All'indomani il gel viene sottoposto ad un processo multi-step:

- Viene lavato per 5 min con acqua deionizzata;
- Si lascia per 30 min in una soluzione di 1% glutaraldeide e 0,5M sodio acetato;
- Si lava 3x10 min con acqua deionizzata;
- Viene incubato 2x30 min con una soluzione di acido 2,7-naftalene disulfonico 0,05%;
- Al termine di questo periodo di incubazione il gel è nuovamente lavato 4x15 min con acqua deionizzata;
- Viene quindi colorato in una soluzione fresca di nitrato di argento 2,5% e ammoniaca 30% per 30 min;
- Dopo la colorazione, il gel è lavato con acqua deionizzata 4x4 min e sviluppato in soluzione di acido citrico 0,01% e formaldeide 0,1% per 3:40 min;
- La reazione è stoppata con una soluzione di Tris 5% e acido acetico al 2%.

Tutte gli steps della colorazione sono condotti a temperatura ambiente e sotto agitazione, inoltre i tempi di sviluppo sono mantenuti costanti per tutti i gel per poter fare confronti quantitativi oltre che qualitativi tra gel differenti.

Gel Preparativi

Per l'identificazione delle proteine d'interesse occorre estrarre queste ultime dal gel perché possano poi essere sequenziate tramite spettrometria di massa MALDI-TOF; la colorazione all'argento utilizzata non risulta però compatibile con la spettrometria di massa, pertanto occorre realizzare gel preparativi che saranno colorati con il Coomassie Colloidale; una colorazione meno sensibile di quella all'argento.

Questa procedura richiede quindi di caricare un quantitativo maggiore di proteine, nel nostro caso abbiamo caricato 1500 µg.

Prima dimensione

Per i gel preparativi si carica un volume di campione pari a 1500 µg e si arriva ad un volume finale di 400 µl con la soluzione di reidratazione. Si utilizzano sempre strip da 18 cm con un gradiente lineare di pH 3-10 e si aggiungono al momento 0,5% di anfoliti.

Cambia il programma utilizzato (Tabella 8):

Tabella 8. *Isoelettrofocusing per gel preparativi*

| | | | |
|---------------|------|-------|------|
| reidratazione | 1h | 0V | 16°C |
| I step | 12 h | 30V | 16°C |
| II step | 11h | 200V | 16°C |
| III step | 2 h | 300V | 16°C |
| IV step | 3h | 3500V | 16°C |
| V step | 3h | 3500V | 16°C |
| VI step | 15 h | 5000V | 16°C |

Seconda dimensione e colorazione

La procedura della seconda dimensione è analoga a quella utilizzata per i gel analitici ma per la colorazione si utilizza il Coomassie Brilliant Blue G-Colloidal che, a differenza della colorazione all'argento, è compatibile con la spettrometria di massa. Il *Coomassie Colloidale* contiene:

0,12% Coomassie Brilliant Blue G-250

10% Ammonio solfato

2% Acido fosforico.

Il colorante così preparato deve essere diluito al momento dell'utilizzo con il metanolo (4 parti di colorante per 1 di metanolo) agitando per 30 secondi. La colorazione prevede pochi passaggi:

- Terminata la corsa, il gel viene lasciato per un'ora, in agitazione, nella soluzione di fissaggio contenente il 7% di acido acetico ed il 40% di metanolo;
- Il gel è messo in incubazione nel colorante dalle 2 alle 12 ore;
- Si sostituisce il colorante con una soluzione di acido acetico (10%) e metanolo (25%) mantenendo il gel in agitazione, a temperatura ambiente, per 60 secondi;
- Si cambia la soluzione con un'altra di metanolo (25%), sempre agitando il gel, sostituendola dopo pochi secondi con una nuova di metanolo (25%) che può essere lasciata fino a 24 ore.

Analisi dei Gel Tramite Image Master 2D Platinum

Le immagini dei gel sono state acquisite tramite uno scanner (Epson Expression 1680) e analizzate con il programma Image Master 2D Platinum 5.0 dell'Amersham Bioscience. Tramite software si possono mettere a confronto i gel ottenuti dall'elettroforesi bidimensionale della saliva. Gli spots proteici di ciascun gel sono selezionati, numerati e confrontati (sovrapposti). I gel sono divisi nelle diverse classi in modo che il programma sia poi in grado di effettuare un confronto tra i gel all'interno della stessa classe e tra classi diverse. Il programma permette, infatti, di evidenziare eventuali variazioni nell'entità e/o nella presenza o assenza di determinate proteine. Dopo la messa in evidenza degli spot nei gel, sempre mediante software vengono generati dei gel sintetici uno per ciascuno dei gruppi di soggetti di volta in volta esaminati. Ciascuno dei gel sintetici contiene esclusivamente gli spot comuni a tutti i singoli gel del gruppo in esame ovvero solo gli spot espressi nella totalità dei gel del gruppo di soggetti in esame può entrare a far parte del gel sintetico. La finalità dei gel sintetici è stata quella di isolare un numero definito di proteine di interesse che sono state poi caratterizzate mediante spettrometria di massa. La valutazione quantitativa della densità ottica delle proteine nei diversi gruppi di soggetti in studio è, invece, stata valutata mediante il confronto delle medie dei singoli valori ottenute considerando gli spots proteici dei singoli gel di ciascun gruppo.

IIIe. MALDI-TOF

Preparazione dei campioni per MALDI-TOF

Gli spots proteici di interesse sono tagliati dal gel utilizzando per la digestione la tripsina seguendo la seguente procedura:

- i gel ottenuti mediante 2-DE vengono trattati con bicarbonato di ammonio 50mM e acetone (AcN) 30% per 30' a temperatura ambiente
- i gel vengono disidratati per 30' in una centrifuga Hetovac (HETO, Allerod, Denmark) e quindi reidratati per 45' a 4°C in 5-20 µl di una soluzione 50 mM di bicarbonato di ammonio contenente tripsina a 6.25 ng/ µl
- Dopo il periodo di incubazione di una notte, i gel vengono disidratati in centrifuga, reidratati con 20 µl di H₂O e alla fine disidratati di nuovo
- L'eluizione dei peptidi viene effettuata con 20 µl di acido trifluoroacetico (TFA) all'0.1% per 20' a temperatura ambiente
- La soluzione di TFA contenente le proteine di è trasferita in un tubo di propilene
- Una seconda eluizione dei peptidi viene effettuata con 20 µl di TFA allo 0'1% in 50% AcN per 20' a temperatura ambiente
- Le due eluizioni vengono poste insieme e il volume complessivo viene ridotto di 1-2 µl per evaporazione
- Estrazioni di controllo vengono effettuate utilizzando parti dei gel privi di proteine
- Gli spots sono così inviati al Core Facility Proteomic (Università di Ginevra) per l'analisi spettrometrica che consente di identificare le proteine.

Identificazione proteica mediante finger printing (MALDI-TOF)

Prima del finger printing, le soluzioni contenenti i peptidi vengono addizionate con TFA allo 0.1% in 50% AcN e portate ad un volume di 5 µl. Un microlitro di ciascun campione viene depositato su una piastra 2 x 96 della MALDI e portato a secco sottovuoto. Viene aggiunto un ugual volume di matrice (10 mg/ml α -cyano-4-hydroxycinnamic acid in 50% AcN, 0.1% TFA). I campioni vengono portati a secco sottovuoto nuovamente. La MS è stata condotta mediante lo spettrometro Voyager super STR (Applied Biosystems, Foster City, CA) corredato di un laser nitrogene di 337 nm. L'analisi è stata eseguita in reflectrone con un acceleratore di voltaggio di 20 kV, un parametro di ritardo di estrazione di 350 ns, e un limite basso di massa di 850 Da. Gli spettri sono stati ottenuti dalla somma di 150-300 spari laser consecutivi. I picchi di massa sono stati estratti dagli spettri e l'identificazione proteica è stata effettuata utilizzando il MASCOT 2.1 peptide mass

fingerprint tool e il motore di ricerca ProFound del PROWL (<http://prwl.rockefeller.edu>). Come databases sono stati utilizzati il SWISS_PROT e il TrEMBL utilizzando come limiti per la ricerca i seguenti: specie umana, tolleranza della massa ± 50 ppm, clivaggio perso con la tripsina fino a 1 e modificazioni della cisterna per carbamidometilazione.

III f. Analisi Statistica

I valori di densità ottica delle proteine di interesse sono stati espressi come % di volume. L'analisi statistica di comparazione tra i livelli di espressione delle singole proteine nella saliva dei pazienti arruolati è stata effettuata mediante test ANOVA per il confronto delle medie tra più gruppi analizzati simultaneamente e mediante *t*-test per il confronto delle medie dei gruppi a due a due. Un p-value <0.05 è stato considerato statisticamente significativo.

IV. RISULTATI

IVa. ANALISI DEI GEL SINTETICI

Le figure allegate rappresentano rispettivamente le immagini dei gel sintetici e dei gel rappresentativi ottenuti dalla saliva dei soggetti sani e dei pazienti con SjS, Sclerodermia, sindrome secca, e profilo autoanticorpale patologico: anti-SSA e anti-SSA + anti-SSB positivi. (Fig 6-17 vedi allegati)

Il confronto della percentuale di volume degli spot presenti nei gel sintetici dei gruppi in esame, considerati a due a due, ha evidenziato differenze statisticamente significative nell'espressione qualitativa e quantitativa di numerose proteine salivari.

In particolare, comparando il gel sintetico ottenuto dal gruppo di pazienti affetti da SjS con quello dei controlli, è stato possibile identificare 10 spots presenti solo nel gel sintetico patologico e 4 spots presenti solo in quello dei controlli. Nell'ambito dei 10 spots è stata evidenziata la presenza di diverse proteine con pI tra 5,0 e 6,5 e PM intorno a 30-45 Kda, come il precursore della Zn- α_2 -glicoproteina (spot n° 33)*, anche se l'analisi di massa non è stata in grado di identificare la totalità degli spots (spots n°48, 46, 30, 34). E' inoltre stato possibile documentare la presenza di numerose proteine coinvolte nei processi flogistici come: la calgranulina B, la lipocalina e la fosfatidiletanolamina binding protein, nonché, spots (n°47) relativi all'espressione della catena leggera κ delle immunoglobuline. Nell'ambito degli spots presenti solo nel gel sintetico dei controlli è invece da sottolineare quello (spot n° 29) relativo alla carbonato anidrasi VI e alle cistatine e ai loro precursori (cistatina D, C, S) (spots n° 5,7,12). La tabella 9 riassume le principali differenze qualitative che lo studio ha permesso di evidenziare. La tabella 10 mostra, invece, le differenze quantitative relative alle proteine la cui espressione differisce di almeno due volte nei due gruppi. L'analisi dei gel, infatti, ha mostrato 14 spots caratterizzati da una diversa intensità tra pazienti e controlli: 10 spots mostravano un costante incremento (spots n°10, 35, 36, 32, 17, 2, 4, 18, 19, 21) nei malati rispetto ai controlli mentre 4 risultavano significativamente meno intensi (spots n°40, 9, 23, 16) nei pazienti con SjS (102,103).

**I numeri degli spots si riferiscono ai gel rappresentativi*

Tabella 9. Proteine presenti esclusivamente nel gel sintetico dei pazienti con Sjs o nei soggetti sani

| Spot No | Protein | Swiss-Prot accession no | Mr (x10 ³) | pI | sequence coverage% | Matched peptides |
|-----------------------|--|-------------------------|------------------------|------|--------------------|------------------|
| Controlli sani | | | | | | |
| 5 | Cystatin D | P28325 | 16.1 | 7.63 | 31 | 5 |
| 7 | Cystatin C precursor | P01034 | 16 | 9.00 | 49 | 14 |
| 12 | Cystatin S precursor | P01036 | 16.4 | 4.95 | 68 | 12 |
| 29 | Carbonic anhydrase VI | Q5FC00 | 35.4 | 8.43 | 24 | 9 |
| Sjs | | | | | | |
| 41 | Calgranulin B | P06702 | 13.2 | 5.71 | 76 | 9 |
| 42 | Cyclophilin A | P62937 | 18 | 7.82 | 85 | 17 |
| 43 | Lipocalin-1 precursor | P31025 | 19.4 | 5.39 | 31 | 4 |
| 45 | Phosphatidyl ethanolamine binding protein (PEBP) | P30086 | 21 | 7.42 | 92 | 20 |
| 47 | IGKC protein | Q6GMW1 | 26 | 7.55 | 41 | 8 |
| 33 | Zinc- α_2 -glycoprotein precursor | P25311 | 34 | 5.57 | 23 | 11 |

Tabella 10. *Proteine espresso con diversa concentrazione nei gel sintetici dei SjS e dei controlli sani*

| Spot No | Protein name | Swiss-Prot accession no. | Mr(x10 ³) | | pI | | sequence coverage % | Matched peptides | Score |
|---------|--|--------------------------|-----------------------|--------|-------|--------|---------------------|------------------|-------|
| | | | Theor | Observ | Theor | Observ | | | |
| 10 | fatty acid-binding protein(E-FABP) | Q01469 | 15.3 | 12.0 | 6.84 | 6.48 | 68 | 17 | 108 |
| 35 | ACTB protein (actin) | Q96E67 | 40.5 | 40.1 | 5.55 | 5.24 | 57 | 21 | 114 |
| 36 | β-actin fragment | Q96HG5 | 41.3 | 41.0 | 5.56 | 5.04 | 23 | 8 | 50 |
| 32 | leukocyte elastase inhibitor | P30740 | 42.8 | 40.7 | 5.90 | 6.08 | 23 | 8 | 43 |
| 17 | glutathione-S-transferase | P09211 | 23.4 | 23.4 | 5.44 | 5.56 | 32 | 6 | 48 |
| 40 | α-amylase precursor | P04745 | 58.4 | 54.9 | 6.47 | 6.40 | 62 | 31 | 177 |
| 9 | cystatin SN precursor | P01037 | 16.5 | 12.0 | 6.82 | 7.52 | 69 | 10 | 105 |
| 23 | keratin 6-L | Q5XKE5 | 58 | 33.1 | 6.75 | 4.52 | 14 | 7 | 37 |
| 16 | prolactin-inducible protein precursor(PIP) | P12273 | 16.8 | 14.8 | 8.26 | 4.64 | 69 | 10 | 105 |
| 18 | not identified | -- | nd | 23.4 | nd | 5.20 | -- | -- | -- |
| 19 | not identified | -- | nd | 23.9 | nd | 5.00 | -- | -- | -- |
| 21 | not identified | -- | nd | 24.5 | nd | 7.32 | -- | -- | -- |
| 4 | not identified | -- | nd | 11.8 | nd | 5.60 | -- | -- | -- |
| 2 | not identified | -- | nd | 42.8 | nd | 6.36 | -- | -- | -- |

Il confronto tra il gel sintetico dei pazienti con Sclerodermia e dei controlli sani ha, invece, messo in luce 20 spots che sono risultati presenti solo nelle immagini bidimensionali dei soggetti con Sclerodermia ed assenti nei controlli. Con la spettrometria di massa è stato possibile identificare 13 di tali 20 spots che sono risultati confluire in 9 proteine identificate come: ciclofillina A (spot n°42), calgranulina B (spots n°41, 52, 53, 54), psoriasina (spot n°55), beta-2-microglobulina (spot n°56), calgranulina A (spot n°57, 58), gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (spot n°64), TPI (spot n°65), complesso Arp2/3 (spot n°67) e cistatina B (spot n°59). La tabella 11 riassume questi risultati.

Nel confronto tra gel sintetico dei pazienti con Sclerodermia e SjS gli spots relativi a psoriasina (spot n°55), calgranulina A (spot n°57, 58), gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (spot n°64), TPI (spot n°65), complesso Arp2/3 (spot n°67) e cistatina B (spot n°59) e carbonato anidrasi VI (spot n°26-29) risultavano presenti solo nel gel sintetico dei pazienti con sclerodermia. Non risultavano, invece, identificabili nel gel sintetico dei pazienti con Sclerodermia gli spot relativi alla E-FABP e alla lipocalina . Ulteriori differenze tra gel sintetici dei pazienti con SjS e Sclerodermia emergevano nell'espressione delle cistatine e dei loro precursori, dell' α -amilasi salivare, della cheratina 6L, della PIP, della glutatione-S-transferasi e dell'inibitore dell'elastasi leucocitaria.

Tabella 11. Spot proteici identificati solo nel gel sintetico dei pazienti con Sclerodermia e non nei controlli

| Spot No | Protein | Swiss-Prot accession no | Mr (x10 ³) | pI | sequence coverage% | Matched peptides |
|---------|---|-------------------------|------------------------|------|--------------------|------------------|
| 41 | Calgranulin B | P06702 | 13.2 | 5.71 | 76 | 9 |
| 52 | Calgranulin B | P06702 | 13.2 | 5.71 | 53 | 5 |
| 54 | Calgranulin B | P06702 | 13.2 | 5.71 | 70 | 7 |
| 53 | Calgranulin B** | P06702 | 13.2 | 5.71 | 55 | 7 |
| 55 | Psoriasis | P31151 | 11.4 | 6.26 | 49 | 7 |
| 56 | β2-microglobulin | Q6LAT8 | 13.8 | 6.06 | 37 | 4 |
| 57 | Calgranulin A | P05109 | 10.8 | 6.51 | 62 | 8 |
| 58 | Calgranulin A | P05109 | 10.8 | 6.51 | 63 | 11 |
| 59 | Cystatin B | P04080 | 11.1 | 6.96 | 64 | 6 |
| 42 | Cyclophilin A | P62937 | 18 | 7.82 | 54 | 11 |
| 64 | Glyceraldeyde-3-**-phosphate dehydrogenase | P04406 | 35.9 | 8.58 | 23 | 5 |
| 65 | Triose phosphate isomerase | P60174 | 26.8 | 6.51 | 62 | 15 |
| 67 | Actin-related protein 2/3 complex subunit 2 | O15144 | 34.4 | 6.84 | 43 | 18 |

I risultati del confronto dei rimanenti gel sintetici sono riassunti nella Tabella 12

Tabella 12: Gel sintetici a confronto

| | | | | | | |
|------------|----------------------------------|---------|------|-----------------------|-----|-------------------|
| vs | Sindrome secca idiopatica | | | | | |
| SjS | lipocalina | amilasi | PEPB | Carbonato anidrasi VI | PIP | Cistatina B, D, S |

| | | | | | | |
|------------|--------------------|---------|-----------------------|-----|-------------------|--|
| vs | Anti-Ro/SSA | | | | | |
| SjS | lipocalina | amilasi | Carbonato anidrasi VI | PIP | Cistatina B, D, S | |

| | | | | | | |
|------------|----------------------------------|---------------------------------|--|--|-----|-------------|
| vs | Sindrome secca idiopatica | | | | | |
| SjS | lipocalina | Inibitore elastasi leucocitaria | | | PIP | Cistatina D |

| | | | | | | |
|---------------------|----------------------------------|-------------|----------------|--------------|-----|----------------|
| vs | Sindrome secca idiopatica | | | | | |
| Sclerodermia | Cistatina B | Cistatina S | Calgranulina B | Cistatina SN | PIP | Ciclofillina A |

| | | | | | | |
|---------------------|--------------------|-------------|----------------|--------------|--------|---------------------------|
| vs | Anti-Ro/SSA | | | | | |
| Sclerodermia | Cistatina B | Cistatina D | Calgranulina B | Cistatina SN | actina | β -2 microglobulina |

| | | | | | | |
|---------------------|----------------------------------|--|---------|--------------|--|--|
| vs | Anti-Ro/SSA + Anti-La/SSB | | | | | |
| Sclerodermia | Cistatina B | | amilasi | Cistatina SN | | |

| | | | | | | |
|--------------------|----------------------------------|--|----------------------|--|----------------------|--|
| vs | Anti-Ro/SSA + Anti-La/SSB | | | | | |
| Anti-Ro/SSA | β -2 microglobulina | | Spot n° 68 (non id.) | | Spot n° 80 (non id.) | |

| | | | | | | |
|--------------------|----------------------------------|--|-------------|----------------|-----|--|
| vs | Sindrome secca idiopatica | | | | | |
| Anti-Ro/SSA | Calgranulina B | | Cistatina S | Calgranulina A | PIP | |

| | | | | | | |
|----------------------------------|----------------------------------|----------------------|----------------|---------------------|--|--|
| vs | Sindrome secca idiopatica | | | | | |
| Anti-Ro/SSA + Anti-La/SSB | amilasi | Spot n° 91 (non id.) | Calgranulina B | Spot n° 5 (non id.) | | |

L'analisi dei gel sintetici data l'alta stringenza dei gel stessi (100%) non permette di valutare in maniera effettiva variazioni qualitative o quantitative nell'espressione delle proteine dal momento

che sono automaticamente esclusi dal sintetico gli spot non condivisi da tutti i singoli gel di ciascun gruppo. Tuttavia essa ha consentito di restringere il campo d'analisi a 15 proteine la cui espressione sembra variare in maniera significativa nei gruppi.

IVb. ANALISI QUANTITATIVA DELLE PROTEINE DI INTERESSE

I dati preliminari hanno consentito di identificare 15 proteine espresse in maniera diversa nei gruppi in esame. Tali proteine sono elencate in Tabella 13 insieme all'analisi quantitativa della percentuale di volume ad esse relativa che è stata condotta misurando le singole percentuali di volume di ciascuno spot di interesse su ciascuno dei gel analitici di ogni gruppo e calcolandone media e deviazione standard.

Tabella 13. Media e deviazione standard della densità ottica delle proteine

| | Controllo sano | | SjS | | Sindrome secca | | Sclerodermia | | SSA | | SSA/SSB | |
|--------------------------|----------------|----------|----------|----------|----------------|----------|--------------|----------|---------|----------|---------|----------|
| | media | DS | media | DS | media | DS | media | DS | media | DS | media | DS |
| amilasi | 2.758571 | 1.049070 | 0.793333 | 0.434885 | 1.412000 | 0.598000 | 3.618000 | 3.120203 | 3.1067 | 2.301127 | 0.9500 | 0.532000 |
| PIP | 9.027143 | 3.641473 | 3.050000 | 2.033273 | 2.060000 | 2.738786 | 5.354000 | 1.742708 | 4.8433 | 1.836264 | 3.5680 | 3.801200 |
| albumina | 2.654286 | 0.627876 | 2.293000 | 2.016339 | 1.727500 | 0.991543 | 3.294000 | 1.229789 | 2.9140 | 1.200637 | 1.4260 | 0.800768 |
| cheratina 6L | 1.844000 | 0.510911 | 0.290000 | 0.485489 | 0.101000 | 0.174937 | 4.910000 | 1.307918 | 2.0325 | 1.607407 | 1.4125 | 1.984698 |
| actina | 0.661000 | 0.250000 | 1.340000 | 0.340000 | 1.236667 | 0.615911 | 0.690909 | 0.309207 | 0.99200 | 0.392173 | 0.9500 | 0.532466 |
| carbonato VI | 3.395714 | 1.375753 | 0.414000 | 0.625392 | 0.690000 | 0.283196 | 0.816000 | 0.578299 | 2.6025 | 2.244777 | 0.2260 | 0.311897 |
| cistatina SN | 4.764615 | 1.882947 | 1.419615 | 0.735749 | 0.967500 | 0.781340 | 6.127833 | 4.283895 | 2.3467 | 0.615169 | 3.4975 | 3.242452 |
| cistatina S | 2.086000 | 0.480240 | 0.735714 | 0.548266 | 0.462250 | 0.221447 | 1.501667 | 0.471950 | 1.2000 | 0.420535 | 0.3375 | 0.430842 |
| cistatina D | 0.734000 | 0.698000 | 0.527273 | 0.621741 | 0.517500 | 0.531311 | 1.640000 | 0.669925 | 0.7520 | 0.353935 | 1.1575 | 0.526712 |
| Imb. Elastasi leuc | 0.170000 | 0.020000 | 0.540000 | 0.110000 | 0.280000 | 0.226936 | 0.218333 | 0.094110 | 0.2470 | 0.40106 | 0.2840 | 0.240217 |
| lipocalina | 0.020000 | 0.056569 | 0.165000 | 0.110454 | 0.031667 | 0.077567 | nd | | nd | | nd | |
| ciclofillina A | nd | | 0.358000 | 0.110454 | 0.260000 | 0.109087 | 0.262857 | 0.089762 | 0.2467 | 0.064291 | 0.1800 | 0.17356 |
| calgranulina B | 0.091667 | 0.142887 | 2.442000 | 1.353706 | 1.890000 | 0.470957 | 3.302857 | 1.353067 | 1.7317 | 0.853379 | 2.6525 | 1.654476 |
| β 2 microglobulina | 0.580000 | 0.370135 | 1.793000 | 0.624000 | 0.887000 | 0.299070 | 1.112500 | 0.615090 | 0.5133 | 0.166693 | 1.08800 | 0.574000 |
| IgKc | 0.272000 | 0.177398 | 0.760000 | 0.214243 | 0.570000 | 0.203000 | 0.243333 | 0.230275 | 0.3645 | 0.194491 | 0.4400 | 0.229637 |

Il confronto delle medie della densità ottica nei gruppi è stato effettuato mediante test ANOVA e i risultati ottenuti sono riassunti in tabella 14.

Tabella 14. Test ANOVA per il confronto delle medie della densità ottica tra i gruppi

| | ANOVA su tutti i gruppi | Espressione nello SjS |
|---------------------------------|----------------------------|-----------------------|
| albumina | p=0,28 | invariata |
| amilasi | p=0,013 | ridotta |
| PIP | p=0,001 | ridotta |
| cheratina 6L | p=0,004 | ridotta |
| carbonato VI | p<0,0001 | ridotta |
| actina | p=0,001 | aumentata |
| cistatina SN | p<0,0001 | ridotta |
| cistatina S | p<0,0001 | ridotta |
| cistatina D | p=0,018 | ridotta |
| Inibitore elastasi leucocitaria | p<0,0001 | aumentato |
| lipocalina | p=0,003 | aumentata |
| ciclofillina A | p=? | aumentata |
| calgranulina B | p=0,001 | aumentata |
| β -2 microglobulina | p=0,0007 | aumentata |
| IgKc | p=0,0013 | aumentata |

Per chiarire il significato delle differenze osservate con il test ANOVA il confronto delle medie della densità ottica dei diversi spot rispetto alla SjS è stato effettuato mediante t-test di Student ed i risultati ottenuti sono riassunti in tabella 15.

Tabella 15. Risultati t-test confronto SjS verso controlli sani e patologici

| p- value (SjS vs..) | sano | sicca | sclero | SSA | SSA/SSB |
|---------------------------|-------------------|--------------|-------------------|---------------|-------------|
| albumina | 0,65 | 0,60 | 0,33 | 0,54 | 0,37 |
| amilasi | 0,0002 | 0,06 | 0,01 | 0,01 | 0,82 |
| PIP | 0,0009 | 0,45 | 0,05 | 0,10 | 0,74 |
| cheratina 6L | 0,0011 | 0,40 | <0,0001 | 0,06 | 0,25 |
| carbonato VI | <0,0001 | 0,42 | 0,25 | 0,01 | 0,54 |
| actina | <0,0001 | 0,69 | 0,0027 | 0,01 | 0,01 |
| cistatina SN | <0,0001 | 0,30 | 0,001 | 0,06 | 0,03 |
| cistatina S | 0,0013 | 0,37 | 0,02 | 0,14 | 0,24 |
| cistatina D | 0,51 | 0,97 | 0,003 | 0,46 | 0,09 |
| Inib. Elastasi leuc | 0,0001 | 0,007 | 0,0001 | 0,03 | 0,01 |
| lipocalina | 0,0056 | 0,02 | nd | nd | nd |
| ciclofillina A | nd | 0,20 | 0,137 | 0,18 | 0,07 |
| calgranulina B | 0,002 | 0,46 | 0,30 | 0,31 | 0,83 |
| β -2 microglobulina | 0,0025 | 0,023 | 0,045 | 0,0004 | 0,06 |
| IgKc | 0,0019 | 0,15 | 0,0015 | 0,005 | 0,04 |

La tabella 16 illustra, infine, i risultati del confronto tra i vari gruppi e i controlli sani.

Tabella 16. Risultati di confronto dei gruppi patologici verso il gruppo di controllo dei soggetti sani ricavati con il t-test di Student

| p- value (sano vs..) | SjS | sicca | sclero | SSA | SSA/SSB |
|---------------------------|-------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| albumina | 0,65 | 0,08 | 0,26 | 0,63 | 0,06 |
| amilasi | 0,0002 | 0,03 | 0,50 | 0,72 | 0,05 |
| PIP | 0,0009 | 0,0049 | 0,06 | 0,03 | 0,01 |
| cheratina 6L | 0,0011 | 0,0014 | 0,001 | 0,33 | 0,42 |
| carbonato VI | <0,0001 | 0,0042 | 0,003 | 0,47 | 0,0005 |
| actina | <0,0001 | 0,023 | 0,8 | 0,06 | 0,18 |
| cistatina SN | <0,0001 | 0,0015 | 0,34 | 0,06 | 0,33 |
| cistatina S | 0,0013 | 0,0004 | 0,07 | 0,01 | 0,0008 |
| cistatina D | 0,51 | 0,59 | 0,03 | 0,95 | 0,31 |
| Inib. Elastasi leuc | 0,0001 | 0,11 | 0,11 | 0,11 | 0,12 |
| lipocalina | 0,0056 | 0,7 | nd | nd | nd |
| calgranulina B | 0,002 | 0,0001 | 0,0001 | 0,0009 | 0,005 |
| β -2 microglobulina | 0,002 | 0,22 | 0,11 | 0,69 | 0,13 |
| IgKc | 0,0019 | 0,03 | 0,82 | 0,43 | 0,25 |

V. DISCUSSIONE

I risultati ottenuti hanno permesso di mettere in evidenza numerose differenze tra il pattern proteico salivare dei pazienti con SjS ed i profili proteici salivari dei soggetti sani e dei controlli patologici.

In particolare nello studio sono state valutate le differenze relative all'espressione delle seguenti proteine salivari:

- proteine salivari acinari (albumina, α -amilasi salivare, PIP, cheratina 6L, anidrase carbonica VI).
- proteine infiammatorie e legate all'autoimmunità (calgranulina B, ciclofillina A, catena leggera κ delle immunoglobuline, beta2-microglobulina)
- proteine coinvolte nell'equilibrio proteasi / antiproteasi (cistatine D, S, SN e loro precursori, inibitore dell'elastasi leucocitaria)
- proteine coinvolte nel danno tissutale (actina, lipocalina-1 precursore)

Il profilo di espressione delle proteine salivari prodotte a livello acinare appare modificato nei pazienti con SjS rispetto ai controlli sani con una riduzione dell'intensità ottica dello spot principale dell'albumina e degli spot dell' α -amilasi salivare, della PIP, della cheratina 6L e della carbonato anidrase VI. E' possibile osservare una riduzione dell'espressione delle suddette proteine acinari (seppure ai limiti della significatività statistica) anche nei profili proteici salivari dei controlli patologici, secondo un gradiente che avvicina i pazienti con SjS a quelli con sindrome sicca idiopatica e ai soggetti asintomatici con anticorpi anti-RoSSA/+ anti-La/SSB e, viceversa, i controlli sani ai soggetti affetti da sclerodermia e ai portatori asintomatici di anti-Ro/SSA. I dati ottenuti sono in linea con gli studi della letteratura che documentano nella saliva dei pazienti con SjS una riduzione dell' α -amilasi salivare e della carbonato deidrogenasi VI (81). Le ipotesi proposte per giustificare la ridotta espressione delle proteine suddette sono fondamentalmente quelle della frammentazione proteica aumentata e quella di una ridotta produzione da danno acinare. La prima ipotesi può giustificare in maniera relativamente lineare la riduzione dello spot principale dell'albumina nei pazienti con SjS: quando esso viene sommato ai frammenti di albumina identificati alla spettrometria di massa, la densità degli spot totali dell'albumina non risulta statisticamente differente nel confronto tra i pazienti con SjS e tutti gli altri gruppi in studio. Anche la riduzione della PIP potrebbe essere correlata sia ad una ridotta

produzione che allo stato di infiammazione subclinica cronica del cavo orale dal momento che nel confronto con i controlli sani essa si riduce in particolare nei soggetti con SjS e con sindrome secca. La PIP è, infatti, una proteina di secrezione presente nella saliva in forma glicosilata e non glicosilata la cui funzione seppure in larga parte ancora da chiarire, sembra essere quella di legarsi ad altre proteine come il fibrinogeno, l'actina, la cheratina, la miosina e la tropomiosina. La PIP si lega anche all'idrossiapatite, componente principale della pellicola dei denti e sembra capace di legarsi ai batteri del cavo orale svolgendo un ruolo potenziale nell'immunità innata e nella difesa delle mucose (104). La riduzione della PIP che è stata evidenziata potrebbe, pertanto, essere analoga a quella della PIP lacrimale descritta nei pazienti con blefarite cronica. Altre due proteine ricche in prolina, che si riducono nei controlli patologici sono l' α -amilasi salivare e la carbonato deidrogenasi VI, la prima è un'idrolasi coinvolta nella digestione buccale dell'amido, la seconda nell'idratazione reversibile del diossido di carbonio e, di conseguenza, nel mantenimento dell'omeostasi del pH salivare. La riduzione della carbonato deidrogenasi è probabilmente la più eclatante al punto che gli spots (es.n° 26-29) che l'identificano sono addirittura mancanti nel gel sintetico dei soggetti con SjS. Il risultato può giustificare anche la tendenza del pH salivare dei pazienti con SjS ad essere complessivamente più basso (pH 6.75 ± 0.41) che nei controlli sani (pH 7.00 ± 0.48). Nel dettaglio nei gel dei soggetti sani è stato possibile identificare tre diversi spots per la carbonato deidrogenasi VI, probabilmente correlabili a isoforme dell'enzima, mentre nei singoli gel dei pazienti con SjS è stato possibile documentarne o una marcata riduzione o addirittura la non espressione. Questo dato è in linea con quanto recentemente pubblicato in letteratura in cui è stata documentata una riduzione dell'espressione del gene della carbonato deidratasi VI nelle ghiandole salivari minori dei pazienti con SjS (105). Una riduzione della carbonato deidrogenasi VI è in realtà evidenziabile anche nei soggetti con sindrome secca, con sclerodermia e nei portatori asintomatici di anti-Ro/SSA+ anti-La/SSB, mentre i valori di densità dei portatori degli anti-Ro/SSA sono sovrapponibili ai controlli sani.

Infine, sempre nell'ambito dell'espressione delle proteine acinari, lo studio ha permesso di documentare una riduzione nell'espressione della cheratina 6L nei soggetti con SjS e sindrome secca ed uno spiccato aumento della stessa nei pazienti con Sclerodermia ($p < 0,0001$), verosimilmente in relazione al processo fibrotico che caratterizza la malattia.

Complessivamente, con l'eccezione della cheratina, relativamente all'espressione delle proteine acinari si conferma quindi lo spettro di riduzione che ha ai due estremi i gel dei pazienti con SjS e i controlli sani. I soggetti con sindrome secca idiopatica e quelli con

anticorpi anti-Ro/SSA+ anti-La/SSB sono più simili ai pazienti con SjS, i pazienti con sclerodermia e quelli con anti-Ro/SSA ai controlli sani.

Accanto alle modificazioni nei livelli di espressione delle proteine salivari tipiche, il pattern proteico salivare dei pazienti con SjS presenta una combinazione di proteine pro-infiammatorie e legate al sistema immunitario. In realtà, proteine infiammatorie come la calgranulina B e la ciclofillina A, sono espresse in maniera aumentata, e non significativamente diversa che nello SjS, anche nei profili salivari dei pazienti con sindrome secca, sclerodermia e autoanticorpi anti-Ro/SSA e anti-Ro/SSA + anti La/SSB. assumendo quindi un significato aspecifico. La ciclofillina A è il prototipo di una famiglia di proteine altamente conservate, coinvolte in molti processi biologici come l'espressione, l'assemblamento e la degradazione delle proteine. Nell'ambito dei processi di flogosi la ciclofillina A sembra agire con meccanismo autocrino e paracrino, come attivatore delle cellule endoteliali contribuendo all'attivazione immuno-mediata e alla disfunzione endoteliale. La calgranulina B, invece, appartiene alla famiglia S100 delle proteine leganti il calcio ed è noto che viene espressa sia nei processi di flogosi acuta che nei processi di flogosi cronica. A differenza della calgranulina B e della ciclofillina A, i pazienti con SjS presentano un aumento statisticamente significativo, rispetto agli altri gruppi di pazienti, della beta-2 microglobulina e dell'espressione della catena leggera κ delle immunoglobuline. Questo risultato, può riflettere l'attivazione policlonale, sistemica e salivare, dei linfociti B nella sindrome di SjS e conferma, anche in questo caso, precedenti osservazioni della letteratura (40, 81).

Un ulteriore elemento peculiare del pattern salivare dei pazienti con SjS presente solo nei soggetti con sindrome secca idiopatica e non nei controlli sani nè nei pazienti con sclerodermia anti-Ro/SSA e anti-Ro/SSA + anti-La/SSB, concerne l'alterazione del bilancio tra proteasi e anti-proteasi salivari. Il dato più rilevante è a carico delle cistatine, S e SN. Le cistatine sono proteine inibitrici delle cistein-proteinasi che svolgono il ruolo di proteggere i tessuti da un'attivazione di sregolata delle proteinasi stesse. Le cistatine sono espresse in una ampia varietà di isoforme che possono differenziarsi per il grado di fosforilazione e/o glicosilazione. Nello studio la loro marcata riduzione può riflettere un consumo da parte delle proteasi considerando la variazione consensuale nella SjS e nelle sindromi sicche idiopatiche della cistatina SN e della S. La cistatina D non sembra presentare modificazioni significative nei pazienti con SJS rispetto ai controlli sani e agli altri gruppi patologici, con l'eccezione della Sclerodermia nella quale i livelli di cistatina D sembrano essere aumentati. Nell'ambito delle alterazioni presentate dal sistema degli

inibitori delle proteasi si osserva, inoltre, in modo peculiare nei pazienti con SjS, un aumento nei livelli di espressione di altre proteine inibitrici di proteasi salivari come la proteina inibitrice dell'elastasi leucocitaria. Questa proteina appartiene alla famiglia delle proteine inibitrici delle serin-proteasi e regola in primis l'attività delle proteasi dei neutrofili /elastasi, catepsina G e proteinasi 3. Il significato ultimo dello squilibrio osservato e la preponderante espressione delle proteine inibitrici le serin-proteasi sulle cistein-proteasi rimane in larga parte da chiarire.

Infine, in generale, nella saliva dei pazienti con SjS si osserva un'ampia espressione di proteine coinvolte nel danno tissutale sia come effettori del danno che come fattori di protezione nei confronti del danno tissutale stesso. Tra esse è stato possibile osservare, nello studio, l'aumento dell'actina e della lipocalina-1. L'actina aumenta in maniera statisticamente significativa nei pazienti con SjS e con sindrome sicca idiopatica mentre la lipocalina-1 solo nei pazienti con SjS. L'actina è una proteina del citoscheletro contenuta in tutti gli elementi cellulari. Un aumento della concentrazione salivare dell'actina è descritto anche nei pazienti con mucositi correlate a radioterapia per neoplasie del cavo orale ed è quindi considerato come marker aspecifico di danno del cavo orale. La lipocalina-1 è, invece, una proteina che agisce come scavenger fisiologico delle molecole che derivano dalla per ossidazione lipidica ma anche come inibitore delle serin-proteasi. Il suo aumento significativo nella saliva dei pazienti con SjS rimane ancora da chiarire ed appare particolarmente interessante considerando che recentemente la lipocalina-1 è stata identificata come potenziale autoantigene nelle lacrime dei pazienti affetti da SjS (106).

VI. CONCLUSIONI

Questo studio ha permesso di caratterizzare mediante analisi proteomica il profilo proteico della saliva dei pazienti con SjS confrontando il pattern ottenuto non solo con quello dei controlli sani ma anche rispetto ai diversi pattern di un gruppo eterogeneo di controlli patologici: pazienti con flogosi cronica del cavo orale ad eziologia non immune, pazienti con malattia autoimmune sistemica e pazienti con profilo autoanticorpale patologico analogo a quello dei pazienti con sindrome di Sjogren ma asintomatici per quanto relativo alla secchezza orale e oculare. I risultati ottenuti, seppure preliminari, hanno mostrato come il profilo proteico salivare dei pazienti con SjS risulti estremamente complesso e presenti aspetti peculiari che in parte riflettono l'impegno flogistico selettivo da parte della malattia delle ghiandole salivari, in parte riflettono le alterazioni del microambiente orale che essa induce e in parte, infine, la natura autoimmune sistemica della SjS. L'analisi a confronto delle modificazioni subite dal pattern proteico salivare normale, nella SjS e nelle altre diverse situazioni patologiche, ha permesso di focalizzare l'attenzione, in particolare, su 15 proteine (albumina, amilasi, proteina inducibile la prolattina, cheratina 6 L, carbonato deidrogenasi VI, cistatina SN, S, D, inibitore dell'elastasi leucocitaria, actina, lipocalina, ciclofillana A, calgranulina B, beta-2-microglobulina e catena leggera kappa delle Ig) e di speculare sull'eziopatogenesi delle modificazioni osservate.

Complessivamente nella SjS si osserva una marcata riduzione delle proteine a secrezione acinare (albumina, amilasi, proteina inducibile la prolattina, cheratina 6 L, carbonato deidrogenasi VI), una riduzione delle cistatine ed un incremento delle proteine inibitrici delle serin proteasi, un aumento delle proteine infiammatorie e delle proteine legate al danno tissutale (actina) ma soprattutto, in maniera specifica, un incremento nell'espressione della beta-2-microglobulina e della catena leggera kappa delle immunoglobuline, riconducibili all'attivazione B cellulare a livello ghiandolare ed un incremento della lipocalina, proteina scavenger, sospettata di svolgere ruolo di autoantigene a livello lacrimale. L'insieme delle alterazioni osservate suggerisce che il dosaggio dei livelli salivari di un numero limitato di proteine, identificate tramite analisi proteomica, possa costituire un valido ausilio nella diagnosi di malattia, configurando una sorta di algoritmo proteico da applicare soprattutto nei casi che rimangono dubbi nelle indagini di diagnostica tradizionale. In conclusione, quindi, seppure a livello preliminare, lo studio ha mostrato come l'analisi proteomica di fluidi biologici, scarsamente complessi

e facilmente reperibili come la saliva, possa rappresentare un'arma utile ed efficace nella diagnosi delle malattie reumatiche, in generale, e della SjS in particolare.

VII. BIBLIOGRAFIA

1. Ramos-Casals M., Tzioufas AG., Font J. Primary Sjogren's syndrome: new clinical and therapeutic concepts. *Ann Rheum Dis* 2005; 64: 347-354
2. Fox RJ. Sjogren's Syndrome. *Lancet* 2005; 366:321-331
3. Thomas E., Hay EM., Hajeer A., Silman AJ. Sjogren's syndrome: a community-based study of prevalence and impact. *Br J Rheumatol* 1998; 37: 1069-1076
4. Pillemer SR., Matteson EL., Jacobsson LT. Incidence of Physician-diagnosed primary Sjogren's syndrome in residents of Olmsted County, Minnesota. *Mayo Clin Proc* 2001; 76; 593-99
5. Bowman SJ., Ibrahim GH., Holmes G., Hamburger J., Ainsworth JR. Estimating the prevalence among Caucasian women of primary Sjogren's syndrome in two general practises in Birmingham, UK. *Scand J Rheumatol* 2004; 33:39-43
6. Trontzas PI., Andrianakos AA. Sjogren's syndrome: a population based study of prevalence in Greece. The ESORDIG study. *Ann Rheum Dis* 2005; 64: 1240-1241
7. Vitali C., Bombardieri S., Jonsson R., Moutsopoulos HM., Alexander EL, Carson SE., et al. Classification Criteria for Sjogren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. *Ann Rheum Dis* 2002; 61:554-8
8. Theander E., Manthorpe R., Jacobsson THL. Mortality and causes of death in primary Sjogren's syndrome. A Prospective cohort study. *Arthritis Rheum* 2004; 50:1262-1269
9. Arnett F. Histocompatibility typing in the rheumatic diseases: diagnostic and prognostic implications. *Med Clin North Am* 1994; 20: 371-87
10. Delaleu N, Jonsson R., Koller MM. Sjogren's syndrome. *Eur J Oral Sci* 2005; 113:101-113
11. Triantafyllopoulou A., Moutsopoulos HM. Autoimmunity and Coxsackievirus Infection in Primary Sjögren's Syndrome. *Ann N.Y. Acad Sci* 2005; 1050: 389–396
12. Skopouli FN., Moutsopoulos HM. Autoimmune epithelitis : Sjogren's syndrome. *Clin Exp Rheumatol*1994 ; 12(S11): 9-11
13. Mitsias DI, Tzioufas AG, Veiopoulou C, et al.: The Th1/Th2 cytokine balance changes with the progress of the immunopathological lesion of Sjögren's syndrome. *Clin Exp Immunol* 2002, 128:562–568.
14. Ogawa N., Ping L., Zhenjun L., Takada Y., Sugai S. Involvement of the interferon-gamma-induced T cell-attracting chemokines, interferon-gamma-inducible 10-kd protein

- (CXCL10) and monokine induced by interferon-gamma (CXCL9), in the salivary gland lesions of patients with Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 2002; 46:2730-41
15. Salomonsson S., Larsson P., Tengner P., Mellquist E., Hjelmstrom P., Wahren-Herlenius M. Expression of the B cell-attracting chemokine CXCL13 in the target organ and autoantibody production in ectopic lymphoid tissue in the chronic inflammatory disease Sjogren's syndrome. *Scand J Immunol.* 2002;55:336-42.
16. Youinou P., Daridon C., Saraux A., Devauchelle V., Pers JO. Is B-cell the conductor of the lymphocyte orchestra in the salivary glands of patients with primary Sjögren's syndrome. *Clin Exp Rheumatol* 2006; 24: 491-492.
17. Bolstad AI., Eiken HG., Rosenlund B., et al.: Increased salivary gland tissue expression of Fas, Fas ligand, cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4, and programmed cell death 1 in primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 2003; 48:174–185.
18. Fox RI., Stern M.: Sjögren's syndrome: mechanisms of pathogenesis involve interaction of immune and neurosecretory systems. *Scand J Rheumatol* 2002; 116:3–13.
19. Beroukas D., Hiscock J., Gannon BJ., et al.: Selective down-regulation of aquaporin-1 in salivary glands in primary Sjögren's syndrome. *Lab Invest* 2002; 82:1547–1552.
20. Hansen A., Lipsky PE., Dorner T. New concepts in the pathogenesis of Sjögren syndrome: many questions, fewer answers. *Curr Opin Rheumatol* 2003; 15:563–570
21. Dawson LJ., Stanbury J., Venn N., Hasdimir B., Rogers SN., Smith PM. Antimuscarinic Antibodies in Primary Sjögren's Syndrome Reversibly Inhibit the Mechanism of Fluid Secretion by Human Submandibular Salivary Acinar Cells. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 1165–1173
22. Skopouli FN., Dafni U., Ioannidis JP., Moutsopoulos HM. Clinical evolution, and morbidity and mortality of primary Sjogren's syndrome. *Semin Arthritis Rheum* 2000; 29:296-304
23. Rolando M. Sjogren's syndrome as seen by an ophthalmologist. *Scand J Rheumatol* 2001; S115: 27-33
24. Soto-Rojas AE., Kraus A. The oral side of Sjogren's syndrome. Diagnosis and treatment. A Review. *Arch Med Research* 2002; 33:95-106
25. Hamburger J. Sjogren's syndrome as seen by an oral physician. *Scand J Rheumatol* 2001; S115: 34-39
26. Ramos-Casals M., Font J., Garcia-Carrasco M., Brito MP., Rosas J., Calvo-Alen J et al. Primary Sjogren syndrome: hematologic patterns of disease expression. *Medicine (Baltimore)* 2002; 81: 281-292

27. Tsioufas AG., Boumba DS., Skopouli FN., Moutsopoulos HM. Mixed monoclonal cryoglobulinemia and monoclonal rheumatoid factor cross-reactive idiotypes as predictive factors for the development of lymphoma in primary Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1996; 39: 767-772
28. Voulgarelis M., Dafni UG., Isenberg DA., Moutsopoulos HM. Malignant lymphoma in primary Sjogren's syndrome: a multicenter, retrospective, clinical study by the European Concerted Action on Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1999; 42: 1765-1772
29. Baldini C., Tavoni A., Merlini G., Sebastiani M., Bombardieri S. Sindrome di Sjogren primitiva: descrizione clinica e sierologica di una casistica monocentrica. *Reumatismo*, 2005; 57(4):256-261
30. Praprotnik S., Bozic B., Kveder T., Rozman B. Fluctuation of anti-Ro/SSA antibody levels in patients with systemic lupus erythematosus and Sjogren's syndrome: a prospective study. *Clin Exp Rheumatol* 1999; 17:63-68
31. Loch H, Pelck R., Manthorpe R. Clinical manifestations correlated to the prevalence of autoantibodies in a large cohort of patients with primary Sjogren's syndrome. A comparison of patients initially diagnosed according to the Copenhagen classification criteria with the American-European consensus criteria. *Autoimmun Rev* 2005; 4:276-281
32. Meyer O. Anti-SSA/Ro and anti-SSB/La antibodies. What's new? *Ann Med Interne (Paris)*. 2002;153:520-9
33. Ulbricht KU., Schmidt RE., Witte T. Antibodies against alpha-fodrin in Sjogren's syndrome. *Autoimmun Rev* 2003; 2: 109-113
34. Vitali C, Bombardieri S., Moutsopoulos HM., Balestrieri G., Bencivelli W., Bernstein RM., Bjerrum KB., Braga S., Coll J., de Vita S., et al. Preliminary criteria for the classification of Sjogren's syndrome. Results of a prospective concerted action supported by the European Community. *Arthritis Rheum* 1993; 36:340- 347.
35. Vitali C., Moutsopoulos HM., Bombardieri S. The European Community Study Group on diagnostic criteria for Sjogren's syndrome. Sensitivity and specificity of tests for ocular and oral involvement in Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 1994; 53: 637-647
36. Vivino FB., Gala I. Hermann GA. Change in Final Diagnosis on Second Evaluation of Labial Minor Salivary Gland Biopsies. *J. Rheumatol* 2002; 29: 938-944
37. Greenspan JS, Daniels TE, Talal N, Sylvester RA. The histopathology of Sjogren's syndrome in labial salivary gland biopsies. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1974; 37: 217-229

38. Daniels TE. Labial salivary gland biopsy in Sjogren's syndrome. Assessment as a diagnostic criterion in 362 suspected cases. *Arthritis Rheum* 1984; 27:147-156
39. Pijpe J., Kalk WWI., Bootsma H., Spijkervet FKL., Kallenberg CGM., Vissink A. Progression of salivary gland dysfunction in patients with Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 2007;66: 107-112
40. Stuchell RN., Mandel ID., Baumhart H. Clinical utilization of sialochemistry in Sjogren's syndrome. [J Oral Pathol](#). 1984;13:303-309
41. Cuida M., Halse AK., Johannessen AC., Tynning T., Jonsson R. Indicators of salivary gland inflammation in primary Sjogren's syndrome. *Eur J Oral Sci*. 1997;105:228-33.
42. van der Reijden WA., van der Kwaak JS., Veerman EC., Nieuw Amerongen AV. Analysis of the concentration and output of whole salivary constituents in patients with Sjogren's syndrome. *Eur J Oral Sci*. 1996;104: 335-340
43. Moutsopoulos HM, Karsh J, Wolf RO, Tarpley TM, Tylden A, Papadopoulos NM. Lysozyme determination in parotid saliva from patients with Sjogren's syndrome. *Am J Med* 1980; 69:39-42
44. Jezequel N., Depasse F., Jouquan J., Lelong A., Roncin S., Pare G., Pennec YL., Youinou P. Salivary lactoferrin in primary Sjogren's syndrome. *Clin Exp Rheumatol*. 1989;7:123-5
45. Sreebny L., Zhu WX. Whole saliva and the diagnosis of Sjogren's syndrome: an evaluation of patients who complain of dry mouth and dry eyes. Part 1: Screening tests. *Gerodontology*. 1996;13:35-43
46. Wu AJ, Lafrenie RM, Park C et al. Modulation of MMP-2 (gelatinase A) and MMP-9 (gelatinase B) by interferon-gamma in a human salivary gland cell line. *J Cell Physiol* 1997;171:117-24.
47. Hernandez CC, Donadi EA, Reis ML. Kininogen-kallikrein-kinin system in plasma and saliva of patients with Sjogren's syndrome. *J Rheumatol* 1998;25:2381-4.
48. Kalk WWI., Vissink A., Stegenga B., Bootsma H., Nieuw Amerongen AV., Kallenberg CGM. Sialometry approach for diagnosing Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 2002;61;137-144
49. Choudhary J., Grant SGN. Proteomics in postgenomic neuroscience: the end of the beginning. *Nature Neuroscience* 2004; 5: 440-445.
50. Godovac-Zimmermann J., Soskic V., Poznanovic S., Brianza F. Functional proteomics of signal transduction by membrane receptors. *Electrophoresis* 1999; 20: 952-961.

51. Imam-Sghiouar N., Laude-Lemaire I., Labas V., Pflieger D., Le Caer JP., Caron M., Nabias DK., Joubert-Caron R. Subproteomics analysis of phosphorylated proteins: application to the study of B-lymphoblast from a patient with Scott syndrome. *Proteomics* 2002; 2: 828-838.
52. Graves PR., Haystead ATJ. *Molecular Biologist's Guide to Proteomics Microbiology and Molecular Biol Rev* 2002; 66: 39-63
53. Pandey A., Mann M. Proteomics to study genes and genomes. *Nature* 2000; 405: 837-846.
54. Phizicky E., Bastiaens PI., Zhu H., Snyder M., Fields S. Protein analysis on a proteomic scale. *Nature* 2003; 422: 208-215.
55. Berkelman T., Stenstedt T. 2-D Electrophoresis, using immobilized pH gradients. *Principles and Methods*. Amersham Biosciences 2002; 17-22.
56. Klose J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutation in mammals. *Humangenetik* 1975; 26: 231-243.
57. Gorg A., Postel W., Gunther S., Weser J. Improved horizontal two-dimensional electrophoresis with hybrid isoelectric focusing in immobilized pH gradients in the first dimension and laying-on transfer to the second dimension. *Electrophoresis* 1985; 6: 599-604.
58. Sanchez JC., Rouge V., Pisteur M., Ravier F., Tonella L., Moosmayer M., Wilkins MR., Hochstrasser DF. "Improved and simplified in-gel sample application using reswelling of dry immobilized pH gradients". *Electrophoresis* 1997; 18: 324-327.
59. Candiano G., Bruschi M., Musante L., Santucci L., Ghiggeri GM., Carnemolla B., Orecchia P., Zardi L., Righetti PG. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis* 2004; 25: 1327-1333.
60. Wilkins MR., Williams KL., Appeal RD., Hochstrasser DF. *Proteome research: new frontiers in functional genomics*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg 1997; 1-12.
61. Godovac-Zimmermann J., Brown L. *Perspectives for Functional Proteomics and Mass Spectrometry*. *Mass. Spec. Reviews*, 2001, 20: 1-57
62. Aebersold R., Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 2003; 422: 198-207
63. Fusaro VA., Stone JH. Mass spectrometry-based proteomics and analyses of serum: a primer for the clinical investigator. *Clin Exp Rheumatol*. 2003; 21(S32):S3-14

64. Westermier R., Loland S., Asbury R. La tecnologia proteomica. *Journal of Clinical ligand assay*. 2002. 25: 250-260
65. Bonk T., Humeny A. MALDI-TOF-MS Analysis of Protein and DNA. *The Neuroscientist* 2001; 1: 6-12
66. Langen H., Berndt P., Roder D., Cairns N., Lubec G., Fountoulakis M. Two-dimensional map of human brain proteins". *Electrophoresis* 1999; 20: 907-916.
67. Husi H., Grant SGN. Proteomics of the nervous system. *Trends in Neurosciences* 2001; 5: 259-266
68. Humphrey SP., Williamson RT. A review of saliva: Normal composition, flow, and function. *The journal of prosthetic dentistry* 2001; 85: 162-169.
69. Amado FML., Vitorino RMP., Domingues PMDN., Lobo MJC., Duarte JAR. Analysis of the human saliva proteome. *Expert Rev Proteomics* 2005; 2:521-539
70. Kaufman E., Lamster IB. The diagnostic application of saliva-a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002; 13: 197-212.
71. Drake RR., Cazare LH., Semmes OJ., Wadsworth JT. Serum, salivary and tissue proteomics for discovery of biomarkers for head and neck cancers. *Expert Rev Mol Diagn.* 2005;5:93-100.
72. Huang CM. Comparative proteomic analysis of human whole saliva. *Arch Oral Biol* 2004; 49: 951-962
73. Vitorino R., Lobo M. J., Ferrer-Correira A. J., Dubin, J. R., Tomer K. B., Domingues, P. M., Amado F. M. Identification of human whole saliva protein components using proteomics. *Proteomics* 2004; 4: 1109 -1115
74. Hirtz C., Chevalier F., Centeno D., Egea JC., Rossignol M., Sommerer N., de Périère D. Complexity of the human whole saliva proteome. *J Physiol Biochem* 2005; 61: 469-480
75. Yao Y., Berg EA., Costello CE., Troxler RF, Oppenheim FG Identification of Protein Components in Human Acquired Enamel Pellicle and Whole Saliva Using Novel Proteomics Approaches 2003; 278: 5300-5308
76. Kojima T., Andersen E., Sanchez J. C., Wilkins M. R., Hochstrasser D. F., Pralong W. F., Cimasoni G. Human gingival crevicular fluid contains MRP8 (S100A8) and MRP14 (S100A9), two calcium-binding proteins of the S100 family. *J Dent. Res.* 2000; 79: 740-747.
77. Hardt M, Thomas LR., Dixon SE., Newport G., Agabian N., Prakobphol A., Hall SC., Witkowska HE., Fisher SJ. Toward Defining the Human Parotid Gland Salivary Proteome

and Peptidome Identification and Characterization Using 2D SDS-PAGE, Ultrafiltration, HPLC and Mass Spectrometry. *Biochemistry* 2005; 44: 2885-2899

78. Hu S., Denny P., Xie Y., Loo JA., Wolinsky LE., Li Y., McBride J., Ogorzalek Loo RR., Navazesh M., Wong DT. Differentially expressed protein markers in human submandibular and sublingual secretions. *Int J Oncol* 2004; 25:1423-30.

79. Yang LL., Liu XQ., Liu W., Cheng B., Li MT. Comparative analysis of whole saliva proteomes for the screening of biomarkers for oral lichen planus. *Inflamm Res* 2006; 55:405-7

80. Wong DT. Salivary diagnostics for oral cancer. *J Calif Dent Assoc* 2006;34:303-8

81. Ryu OH., Atkinson JC., Hoehn GT., Illei GG., Hart TC. Identification of parotid salivary biomarkers in Sjogren's syndrome by surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and two-dimensional difference gel electrophoresis. *Rheumatology (Oxford)* 2006;45:1077-86.

82. Hermansson M., Sawaji Y., Bolton M., Alexander S., Wallace A., Begum S., Wait R., Saklatvala J. Proteomic analysis of articular cartilage shows increased type II collagen synthesis in osteoarthritis and expression of inhibin betaA (activin A), a regulatory molecule for chondrocytes. *J Biol Chem* 2004; 279:43514-21

83. De Ceuninck F., Marcheteau E., Berger S., Caliez A., Dumont V., Raes M., Anract P., Leclerc G., Boutin JA., Ferry G. Assessment of some tools for the characterization of the human osteoarthritic cartilage proteome. *J Biomol Tech* 2005;16: 256-65.

84. Ruiz-Romero C., Lopez-Armada MJ., Blanco FJ. Proteomic characterization of human normal articular chondrocytes: a novel tool for the study of osteoarthritis and other rheumatic diseases. *Proteomics* 2005;5:3048-59.

85. Sinz A., Bantscheff M., Mikkat S., Ringel B., Drynda S., Kekow J., Thiesen HJ, Glocker MO. Mass spectrometric proteome analyses of synovial fluids and plasmas from patients suffering from rheumatoid arthritis and comparison to reactive arthritis or osteoarthritis. *Electrophoresis* 2002; 23:3445-56

86. Liao H., Wu J., Kuhn E., Chin W., Chang B, Jones MD., O'Neil S., Clauser KR., Karl J., Hasler F., Roubenoff R., Zolg W., Guild BC. Use of mass spectrometry to identify protein biomarkers of disease severity in the synovial fluid and serum of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2004;50:3792-803

87. Drynda S., Ringel B., Kekow M., Kuhne C., Drynda A., Glocker MO., Thiesen HJ., Kekow J. Proteome analysis reveals disease-associated marker proteins to differentiate RA

- patients from other inflammatory joint diseases with the potential to monitor anti-TNFalpha therapy. *Pathol Res Pract* 2004;200:165-71
88. de Seny D., Fillet M., Meuwis MA., Geurts P., Lutteri L., Ribbens C., Bours V., Wehenkel L., Piette J., Malaise M., Merville MP. Discovery of new rheumatoid arthritis biomarkers using the surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry ProteinChip approach. *Arthritis Rheum* 2005; 52:3801-12
89. An Y., Pu H., He SZ., Li ZG. Identification of biomarkers in serum of early rheumatoid arthritis by proteomic methods *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2005;85:1261-5
90. Tilleman K., Van Beneden K., Dhondt A., Hoffman I., De Keyser F., Veys E., Elewaut D., Deforce D. Chronically inflamed synovium from spondyloarthropathy and rheumatoid arthritis investigated by protein expression profiling followed by tandem mass spectrometry. *Proteomics*. 2005; 5:2247-57
91. Miyamae T., Malehorn DE., Lemster B., Mori M., Imagawa T., Yokota S., Bigbee WL., Welsh M., Klarskov K., Nishimoto N, Vallejo AN., Hirsch R. Serum protein profile in systemic-onset juvenile idiopathic arthritis differentiates response versus nonresponse to therapy. *Arthritis Res Ther* 2005;7:R746-55.
92. Tomosugi N., Kitagawa K., Takahashi N., Sugai S., Ishikawa I. Diagnostic potential of tear proteomic patterns in Sjogren's syndrome. *J Proteome Res* 2005;4:820-5.
93. Stone JH., Rajapakse VN., Hoffman GS., Specks U., Merkel PA., Spiera RF., Davis JC., St Clair EW., McCune J., Ross S., Hitt BA., Veenstra TD., Conrads TP., Liotta LA., Petricoin EF 3rd; Wegener's Granulomatosis Etanercept Trial Research Group. A serum proteomic approach to gauging the state of remission in Wegener's granulomatosis. *Arthritis Rheum* 2005;52:902-910.
94. Fietta A., Bardoni A., Salvini R., Passadore I., Morosini M., Cavagna L., Codullo V., Pozzi E., Meloni F., Montecucco C. Analysis of bronchoalveolar lavage fluid proteome from systemic sclerosis patients with or without functional, clinical and radiological signs of lung fibrosis. *Arthritis Res Ther*. 2006; 8:R160
95. Atzeni F., Bardoni A., Cutolo M., Hunzelmann N., Krieg T., Martini G., Montecucco C., Olski TM., Secchi ME., Valentini G., Zulian F., Sarzi-Puttini P. Localized and systemic forms of scleroderma in adults and children. *Clin Exp Rheumatol* 2006; 24 (S 40):S36-45
96. Denton CP., Black CM., Abraham DJ. Mechanisms and consequences of fibrosis in systemic sclerosis. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2006; 2:134-144
97. Hummers LK. Microvascular damage in systemic sclerosis: detection and monitoring with biomarkers. *Curr Rheumatol Rep* 2006;8:131-137

98. Mason GI., Hamburger J., Matthews JB. Mast cells, extracellular matrix components, TGF β isoforms and TGF β receptor expression in labial salivary glands in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2000; 59:183-189
99. Chisolm DM et al. Labial salivary gland biopsy in Sjogren's syndrome. *Clin Pathol* 1968; 21:656-60
100. Subcommittee for Scleroderma Criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and therapeutic Criteria Committee. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum* 1980; 23: 581-590
101. Peterson GL. Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. *Anal Biochem* 1979; 100: 201-220
102. Baldini C., Giusti L., Bazzichi L., Lucacchini A., Ciregia F., Tavoni A., Bombardieri S.. Analisi Proteomica della saliva nei pazienti con Sindrome di Sjogren primitiva. *Reumatismo* 2006, 58(3)
103. Giusti L, Baldini C, Bazzichi L., Ciregia F., Tonazzini I., Mascia G., Giannaccini G., Bombardieri S., Lucacchini A. Siena Proteomics Proceedings. Proteome analysis of whole saliva: a new tool for rheumatic diseases - the example of Sjögren's syndrome. in press
104. Mirels L., Hand AR., Branin HJ. *J Histochem Cytochem* 1998; 46: 1061-1071
105. Kivela J., Parkkila S., Parkkila AK., Leinonen J., Rajaniemi H. Salivary carbonic anhydrase isoenzyme Vi. *J Physiol* 1999; 520: 315-320
106. Navone R., Lunardi C., Gerli R., Tinazzi E., Peterlana D., Bason C., Corrocher R., Puccetti A. Identification of tear lipocalin as a novel autoantigen target in Sjogren's syndrome. *J Autoimmun* 2005; 25: 229-234.

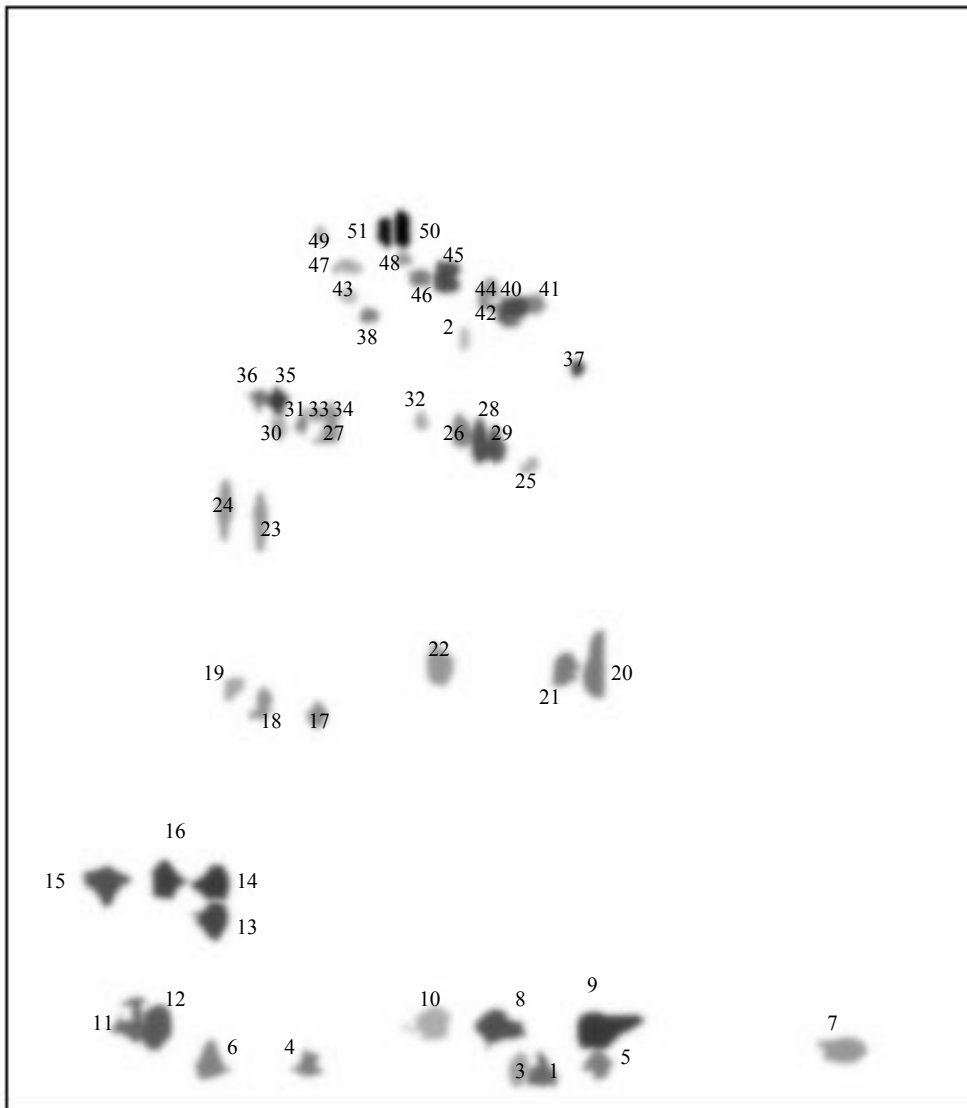


Figura 6: Gel sintetico controllo sano

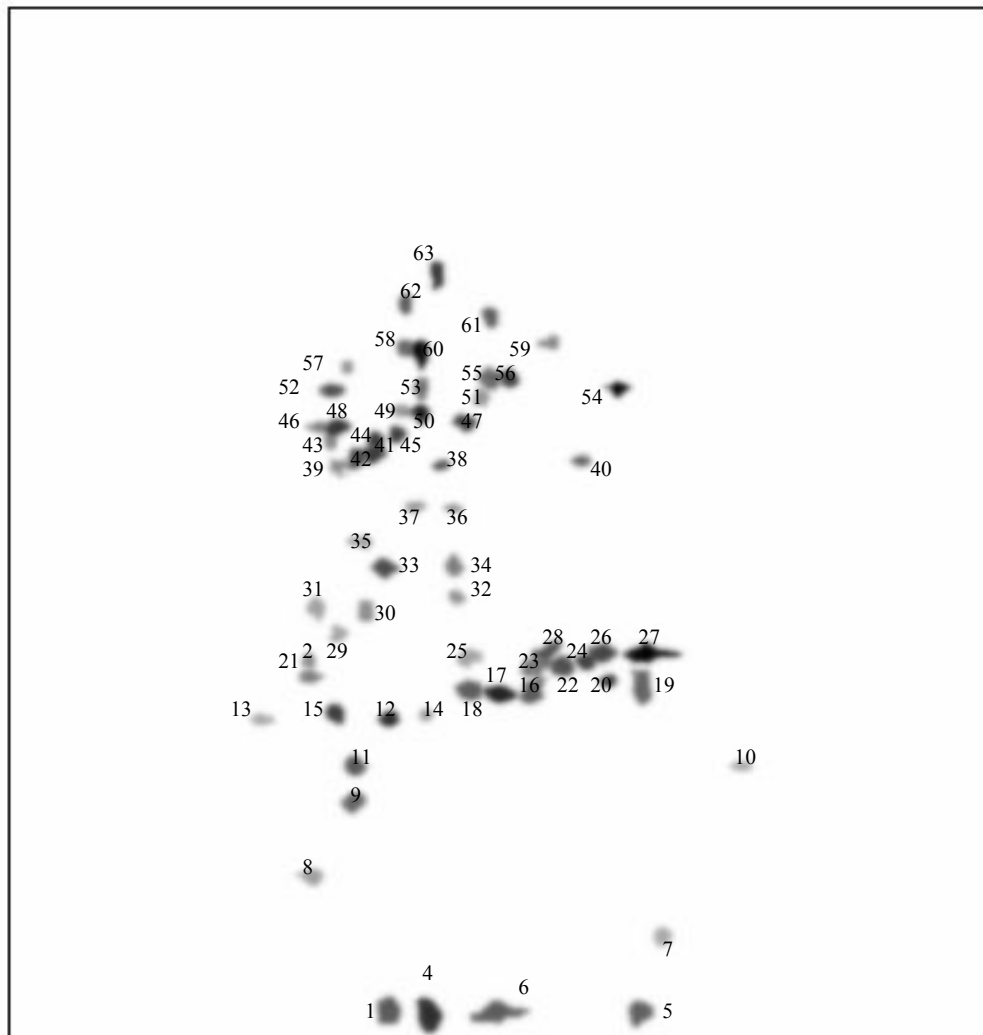


Fig 7: Gel sintetico Sindrome di Sjogren

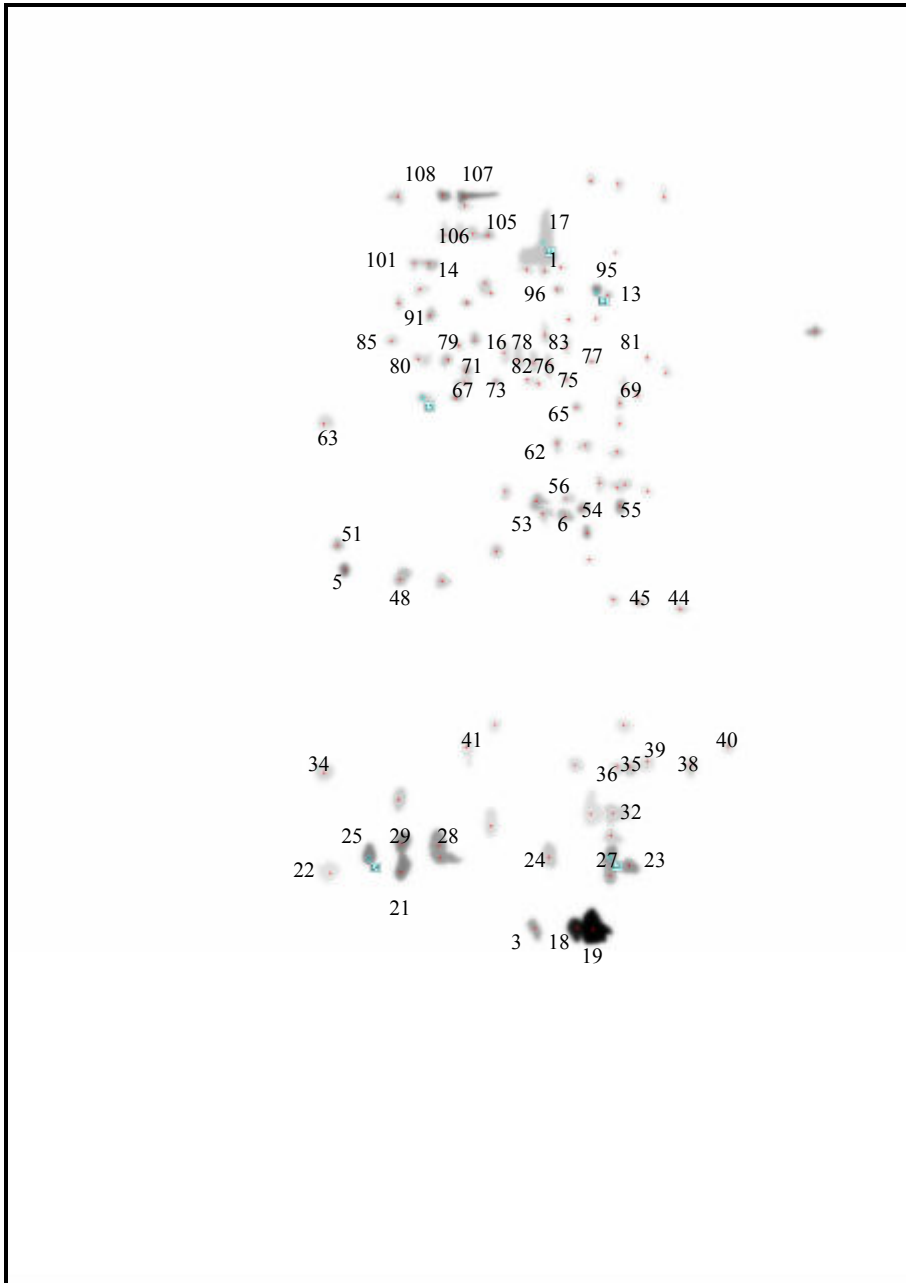


Fig 8: Gel sintetico Sindrome Sicca Idiopatica

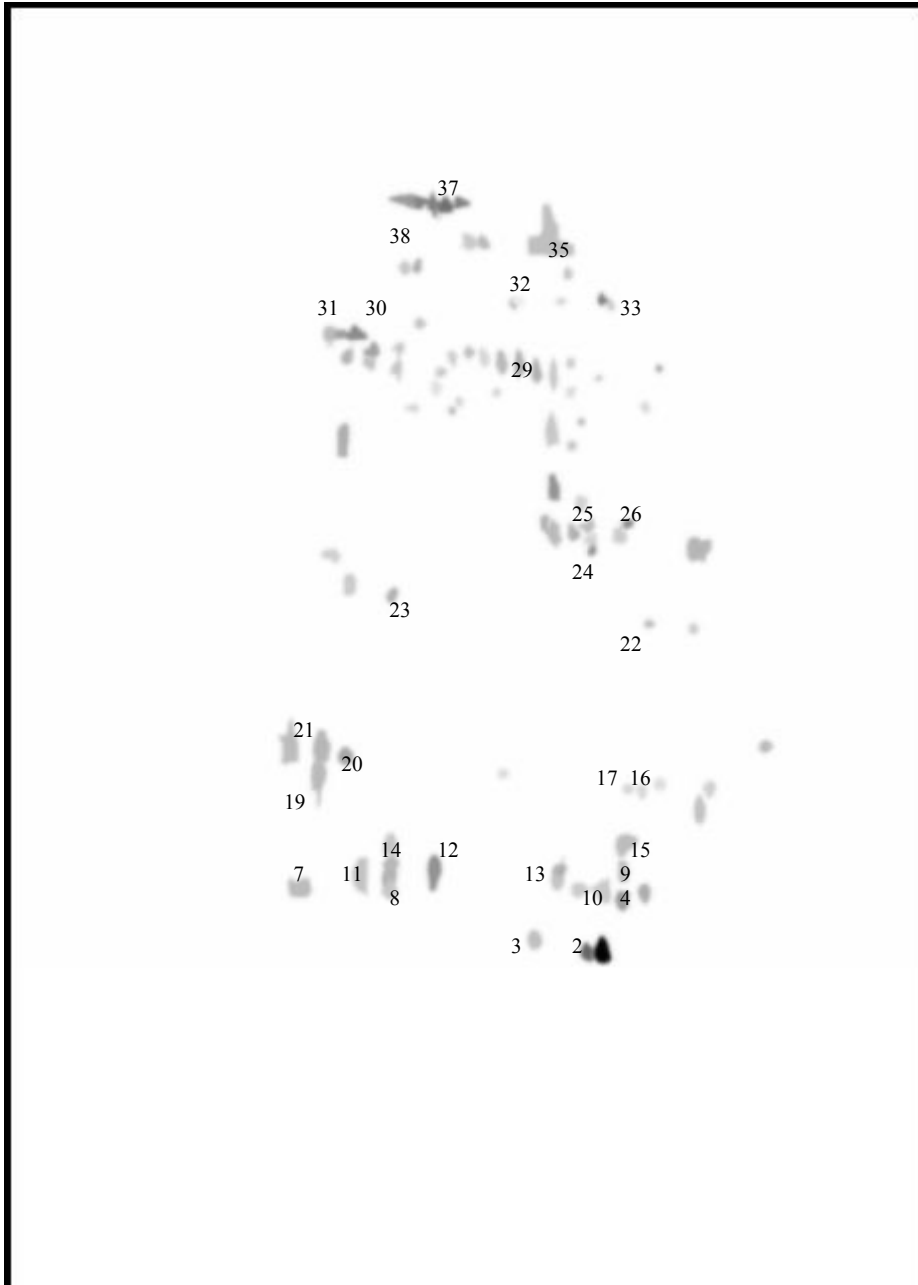


Fig 9: Gel sintetico pazienti con anticorpi anti-Ro/SSA

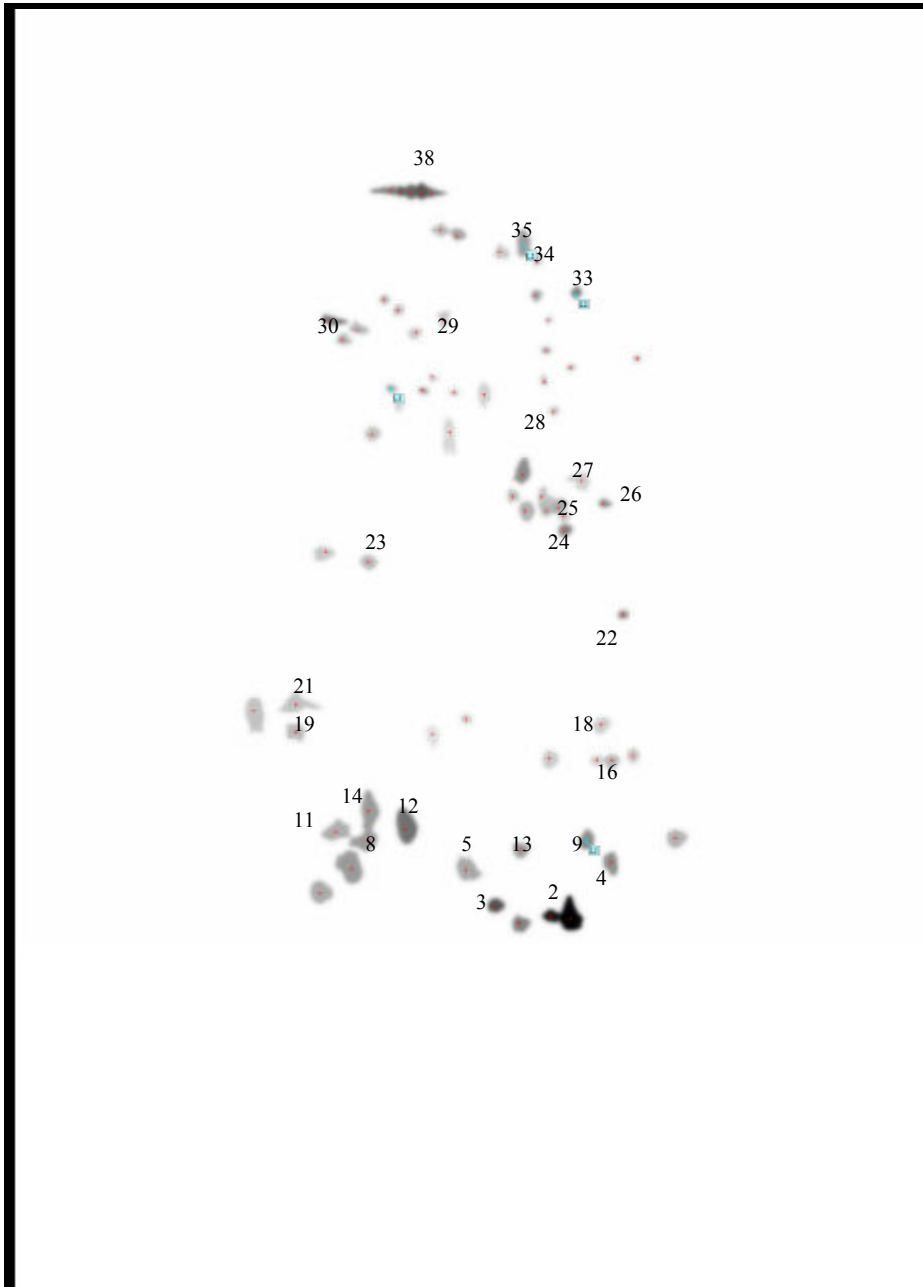


Fig 10: Gel sintetico pazienti con anticorpi anti- Ro/SSA e anti-La/SSB

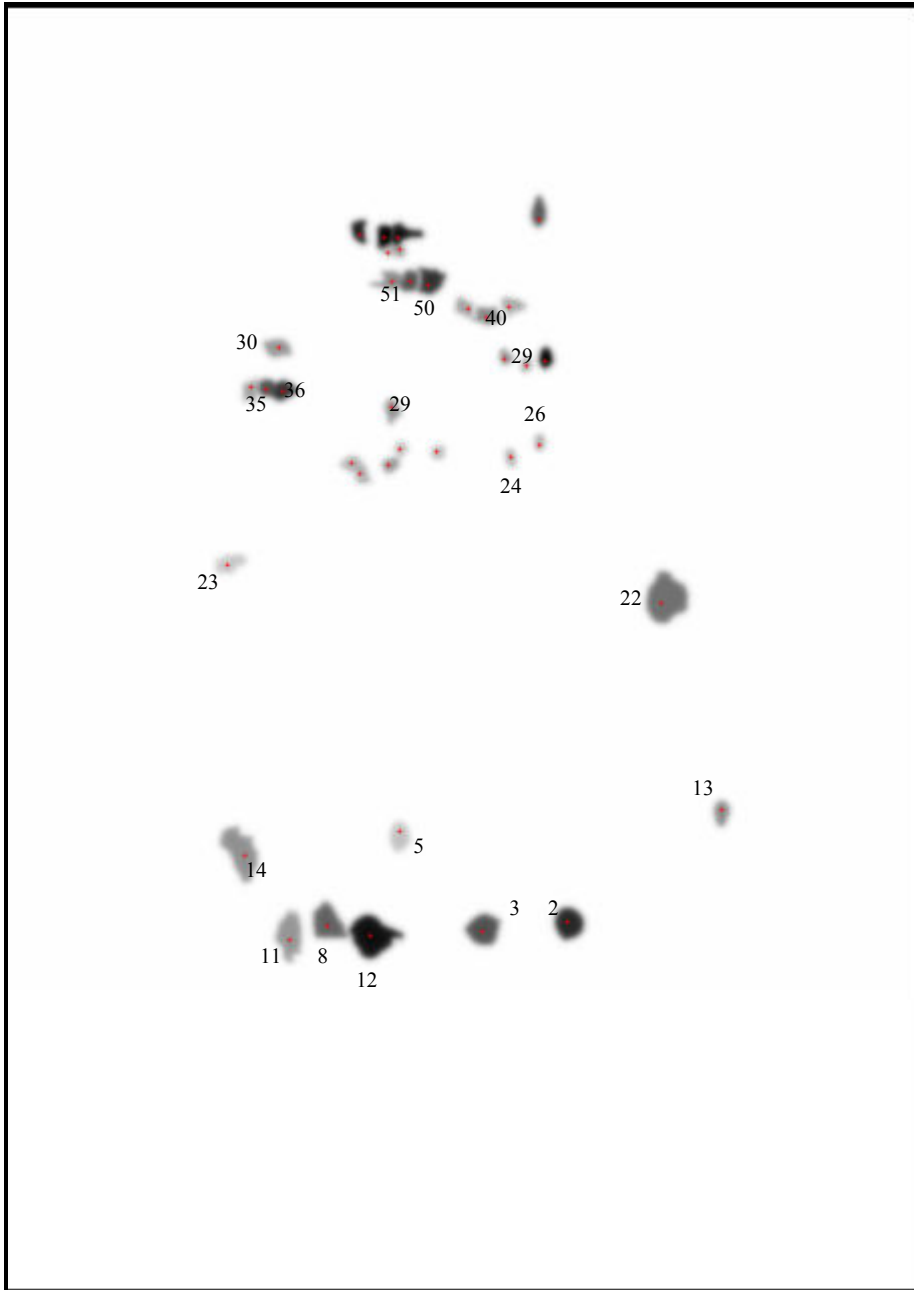


Fig 11. Gel sintetico Sclerosi Sistemica Progressiva

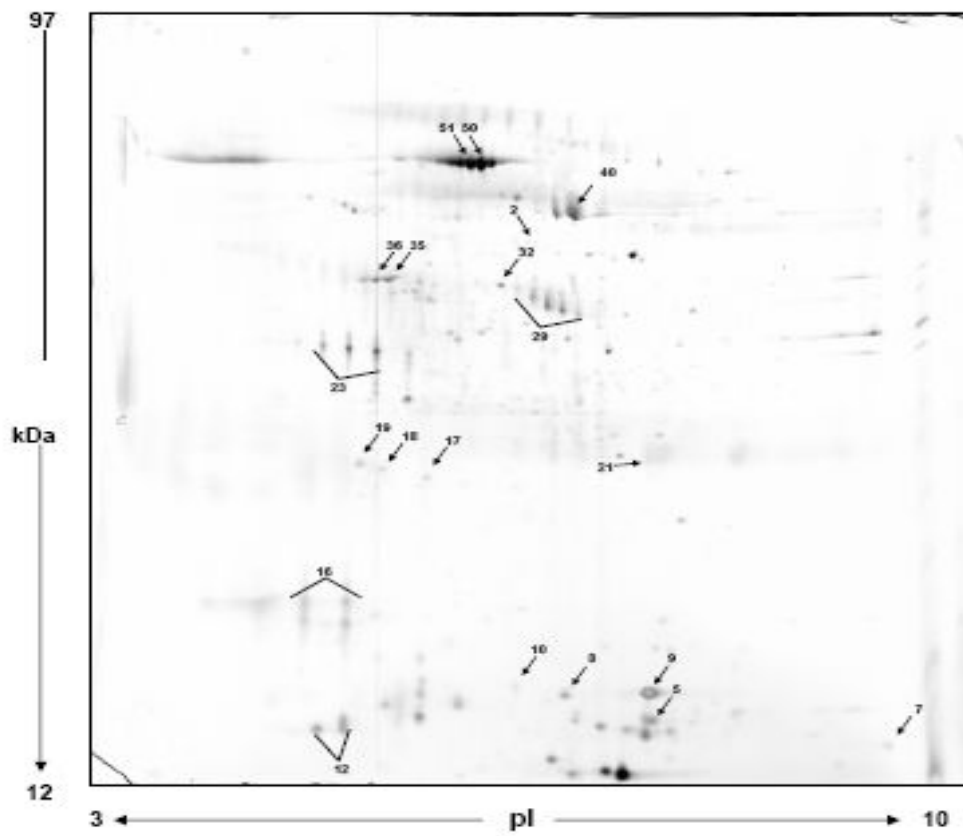


Fig 12: Gel rappresentativo controllo sano

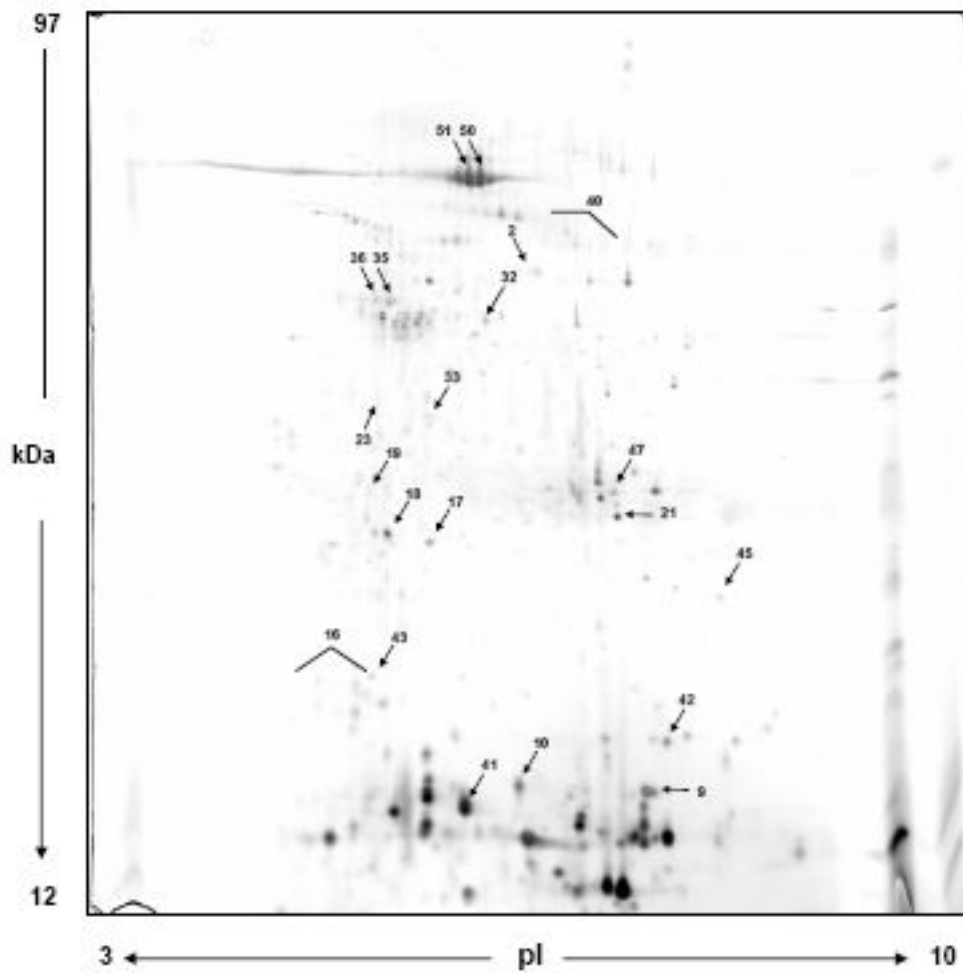


Fig 13: Gel rappresentativo Sindrome di Sjogren

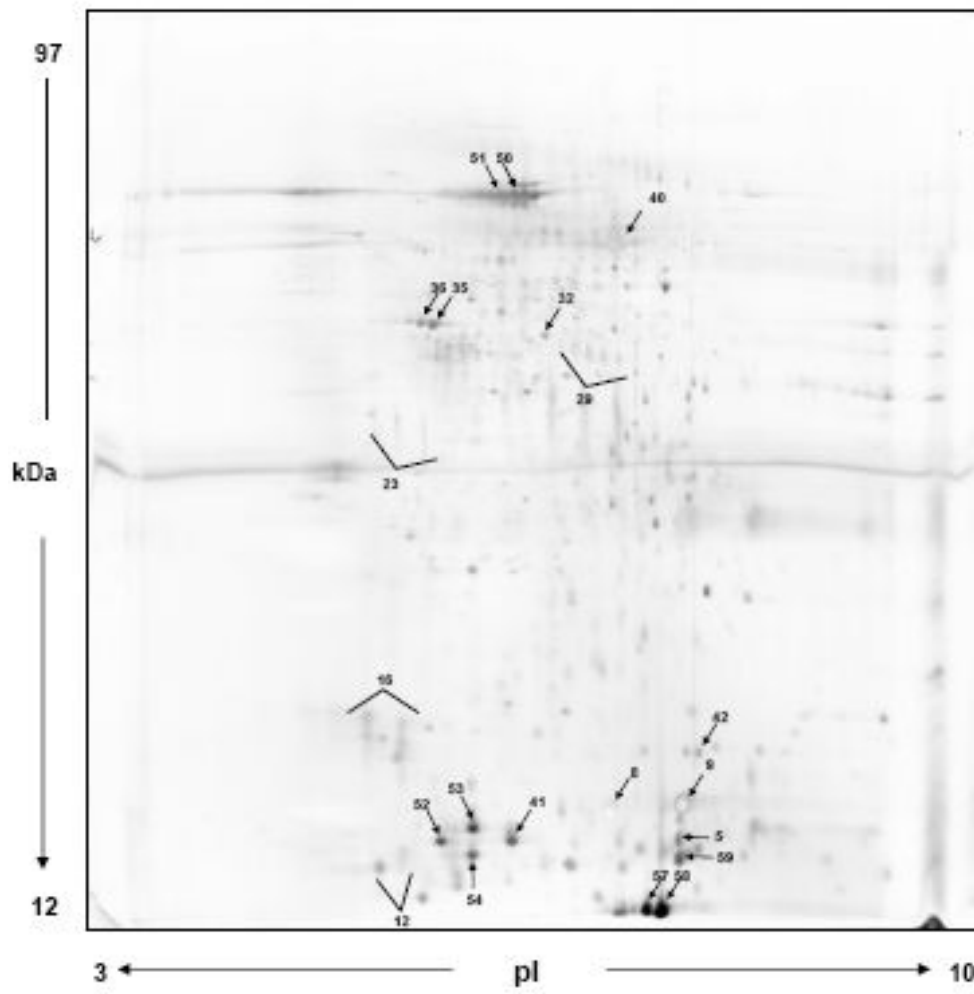


Fig 14: Gel rappresentativo Sindrome Sicca Idiopatica

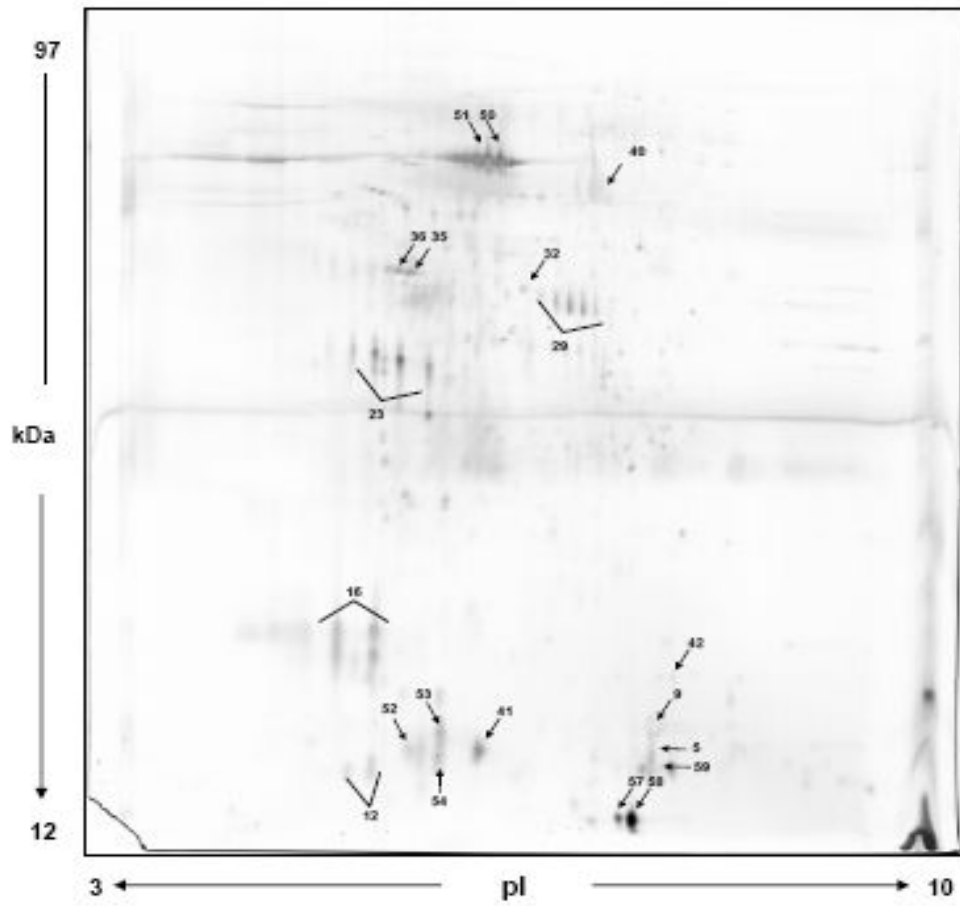


Fig 15: Gel rappresentativo dei pazienti con anticorpi anti-Ro/SSA

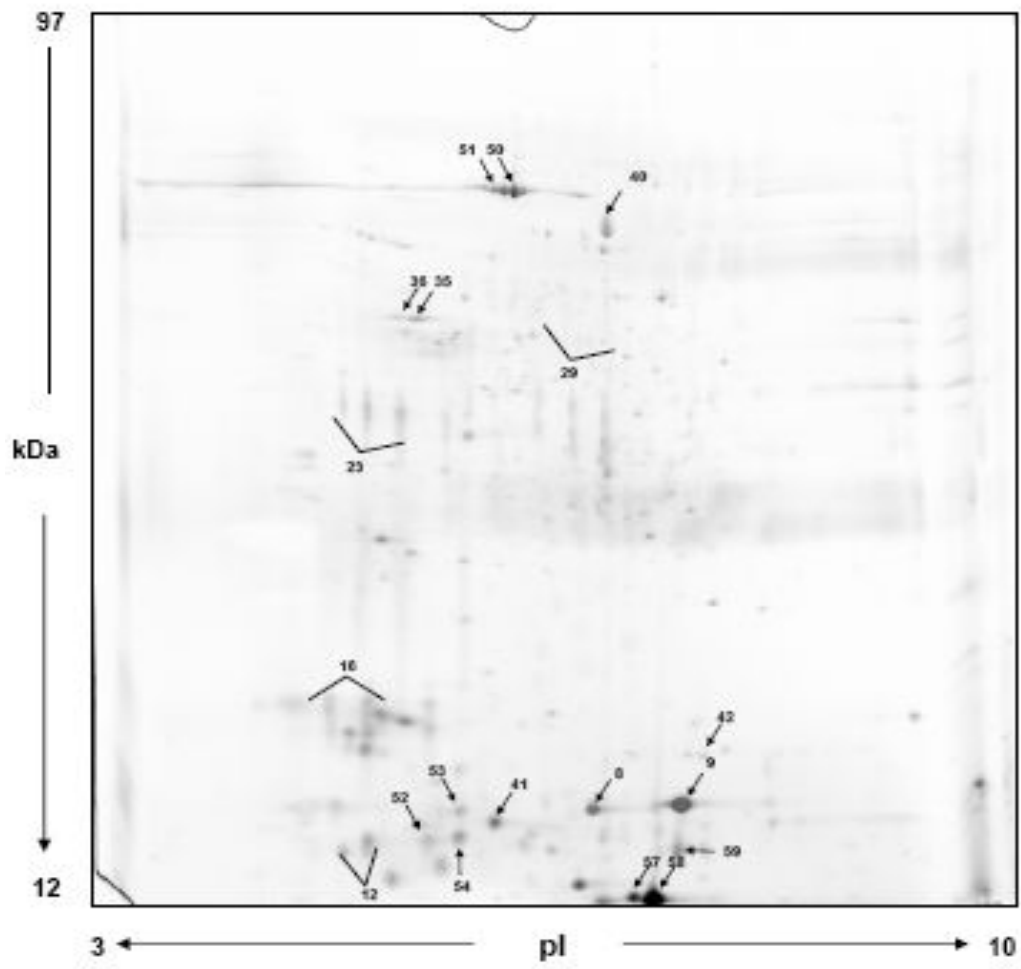


Fig 16: Gel rappresentativo pazienti con anticorpi anti-Ro/SSA e anti-La/SSB

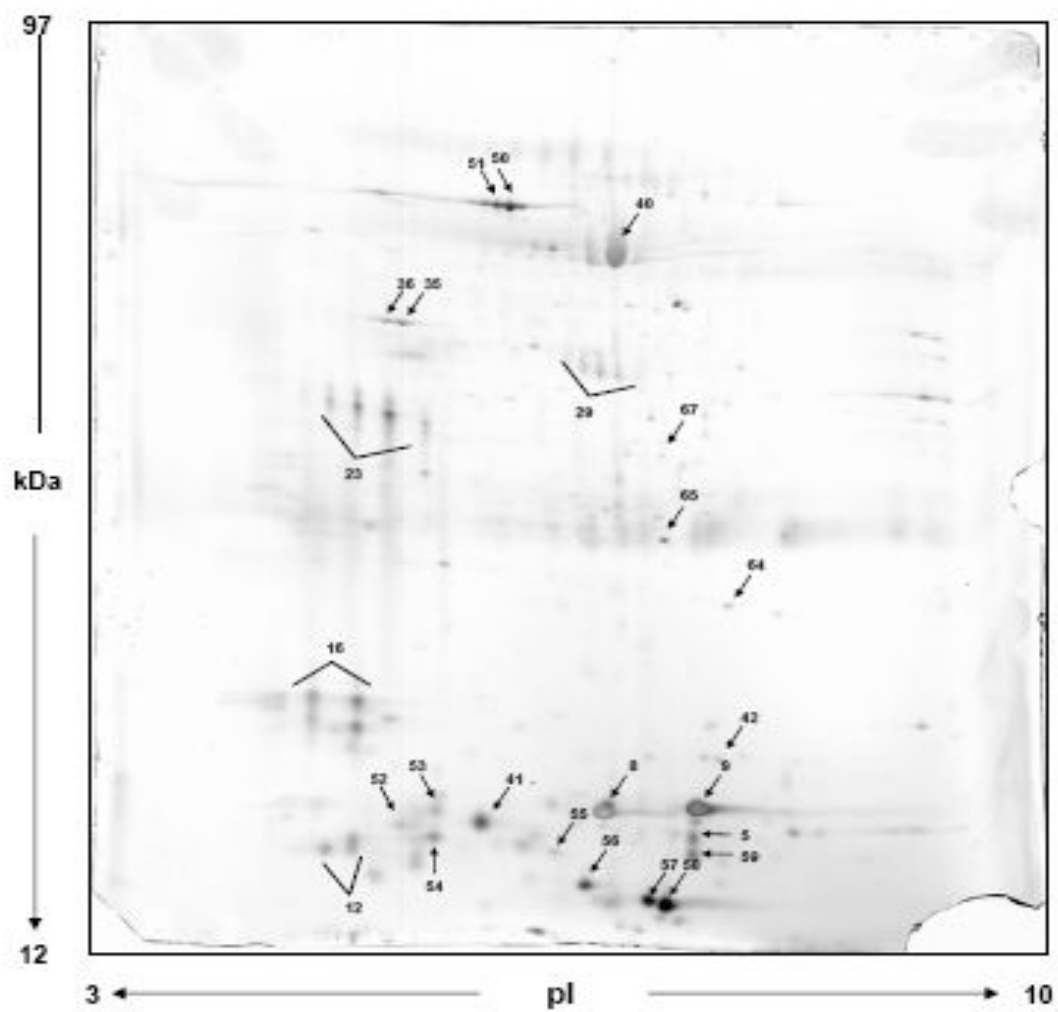


Fig 17: Gel rappresentativo Sclerosi Sistemica Progressiva



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PISA

Facoltà di Medicina e Chirurgia
Dottorato in Fisiopatologia Medica e Farmacologia
Anno Accademico 2005-2006

Tesi di dottorato:

**“Analisi proteomica della saliva
in pazienti affetti da Sindrome di Sjogren primitiva”**

Relatore: Prof. Stefano Bombardieri

Candidato: Chiara Baldini

INDICE:

| | |
|--|-------------------|
| RIASSUNTO | pag. 3-4 |
| I. INTRODUZIONE | |
| Ia. SjS: aspetti epidemiologici, eziopatogenetici, clinici e diagnostici | pag. 5-16 |
| Ib. SjS: modificazioni qualitative e quantitative nella composizione della saliva | pag. 17-18 |
| Ic. La proteomica | pag. 19-26 |
| Id. Applicazioni cliniche dell'analisi proteomica allo studio della saliva | pag. 27-29 |
| II. SCOPO DEL LAVORO | pag. 30-31 |
| III. MATERIALI E METODI | |
| IIIa. Pazienti | pag. 32-33 |
| IIIb. Materiali e strumentazione | pag. 34 |
| IIIc. Raccolta e preparazione del campione | pag. 34-36 |
| IIId. Elettroforesi bidimensionale | pag. 36-42 |
| IIIe. MALDI-TOF | pag. 42-43 |
| IIIf. Analisi statistica | pag. 43 |
| IV RISULTATI | |
| IVa. Analisi dei gel sintetici | pag. 44-50 |
| IVb. Analisi quantitativa delle proteine di interesse | pag. 50-53 |
| V. DISCUSSIONE | pag. 54-57 |
| VI. CONCLUSIONI | pag. 58-59 |
| VII. BIBLIOGRAFIA | pag. 60-68 |
| ALLEGATI | pag. 69-80 |

RIASSUNTO

La Sindrome di Sjogren primitiva (SjS) è una malattia autoimmune sistemica a patogenesi multifattoriale che colpisce in maniera peculiare le ghiandole esocrine salivari e lacrimali. La flogosi cellulo-mediata determina una progressiva compromissione della funzione ghiandolare che si traduce, dal punto di vista clinico, in una tipica sindrome secca caratterizzata da secchezza orale e oculare persistenti.

Scopo del lavoro: considerando la peculiarità della SjS nel coinvolgimento diretto delle ghiandole salivari maggiori e minori, l'ipotesi di lavoro che ha guidato questo studio è stata quella di verificare se il fluido salivare dei pazienti potesse rispecchiare, nella composizione proteica, le alterazioni anatomico-funzionali determinate dalla malattia a livello del tessuto ghiandolare. Scopo del lavoro è stato, quindi, quello di caratterizzare mediante analisi proteomica il profilo proteico salivare di pazienti affetti da SjS e comparare il pattern ottenuto con quello di controlli sani e di un gruppo di controlli "patologici" al fine di identificare eventuali biomarkers di malattia.

Pazienti e metodi: Sono stati arruolati nello studio: 15 pazienti con diagnosi di SjS, formulata in accordo con i Criteri Internazionali validati per la diagnosi di malattia, 15 controlli sani e 30 "controlli patologici" comparabili per sesso ed età. Nell'ambito dei 30 controlli patologici: 15 soggetti risultavano affetti da Sclerodermia sistemica progressiva (malattia autoimmune sistemica in grado di determinare un impegno fibrotico non flogistico delle ghiandole salivari), 6 presentavano una Sindrome Sicca Idiopatica non immunomediata e, 9 soggetti risultavano asintomatici per quanto relativo alla secchezza delle mucose ma erano portatori di autoanticorpi patologici (anti Ro/SSA e anti La/SSB), altamente specifici per la SjS. La caratterizzazione del profilo proteico salivare è stata effettuata combinando l'elettroforesi bidimensionale con la spettrometria di massa (MALDI-TOF mass spectrometry). I campioni sono stati raccolti in condizioni standard, centrifugati a 14000 g per 20 minuti a 4°C per rimuovere materiale insolubile e cellule, opportunamente preparati, e sottoposti ad elettroforesi bidimensionale. La prima dimensione è stata effettuata su strip di 18 cm in cui è presente un gradiente lineare di pH 3-10. La seconda dimensione è stata effettuata su gel di poliacrilammide 12% (20cm×20cm×1,5mm). I gel analitici sono stati colorati mediante Silver staining, mentre i gel preparativi per la spettrometria di massa con il Blu Coomassie Colloidale. Le immagini dei gel sono state acquisite tramite uno scanner (Epson Expression 1680) e analizzate con il programma Image Master 2D Platinum 5.0 dell'Amersham Bioscience. Gli spot di interesse sono stati, infine, identificati mediante MALDI-TOF mass spectrometry.

L'analisi statistica è stata condotta mediante test ANOVA per il confronto delle medie tra più gruppi analizzati simultaneamente e mediante *t*-test per il confronto delle medie dei gruppi a due a due. Un p-value <0.05 è stato considerato statisticamente significativo.

Risultati: Lo studio ha permesso mettere in evidenza numerose differenze tra il pattern proteico salivare dei pazienti con SjS ed i profili proteici salivari dei soggetti sani e dei controlli patologici. In particolare, nei pazienti con SjS è stato possibile osservare una riduzione nei livelli di espressione di alcune tipiche proteine salivari acinari (albumina, α -amilasi salivare, PIP, cheratina 6L, anidrasi carbonicaVI), un'alterata espressione di proteine coinvolte nell'equilibrio proteasi / antiproteasi con una riduzione delle cistatine e dei loro precursori e un incremento dell'inibitore dell'elastasi leucocitaria, un incremento di proteine coinvolte nel danno tissutale (actina, lipocalina-1 precursore) e, infine, un'aumentata espressione di proteine infiammatorie e legate all'autoimmunità (calgranulina B, ciclofillina A, catena leggera κ delle immunoglobuline, beta2-microglobulina).

Conclusioni: Lo studio, seppure preliminare, ha permesso di documentare come il pattern proteico salivare dei pazienti con SjS risulti profondamente alterato e presenti aspetti peculiari che, in parte riflettono l'impegno flogistico selettivo da parte della malattia delle ghiandole salivari, in parte riflettono le alterazioni dell'ambiente orale che essa induce e, in parte, infine, la natura autoimmune sistemica della SjS. L'insieme delle alterazioni osservate suggerisce che il dosaggio dei livelli salivari di un numero limitato di proteine, identificate tramite analisi proteomica, possa costituire un valido ausilio nella diagnosi di malattia, configurando una sorta di algoritmo proteico da applicare soprattutto nei casi che rimangono dubbi nelle indagini di diagnostica tradizionale. Complessivamente, quindi, seppure a livello preliminare, lo studio ha mostrato come l'analisi proteomica di fluidi biologici scarsamente complessi e facilmente reperibili come la saliva possa rappresentare un'ulteriore ausilio nella diagnosi delle malattie reumatiche, in generale, e della SjS in particolare.

I.INTRODUZIONE

Ia. Sindrome di Sjogren: aspetti epidemiologici, eziopatogenetici, clinici e diagnostici

La sindrome di Sjogren (SjS) è una malattia autoimmune sistemica che colpisce caratteristicamente le ghiandole esocrine ed in particolare le ghiandole salivari e quelle lacrimali manifestandosi, clinicamente, con una sindrome secca oculare e orale che deriva dal coinvolgimento anatomico e funzionale delle ghiandole stesse (1).

Dal punto di vista nosografico la malattia può presentarsi in forma isolata (SjS idiopatica o primitiva), oppure in associazione ad altre malattie autoimmuni come l'Artrite Reumatoide, il Lupus Eritematoso Sistemico o la Sclerodermia: si parla in tal caso di SjS secondaria (2).

La SjS primitiva ha una distribuzione ubiquitaria e colpisce preferenzialmente soggetti di sesso femminile (rapporto femmine: maschi = 9:1) con un primo picco di incidenza nella II-III decade di vita ed un secondo picco in età post-menopausale, nella V decade di vita. I dati relativi alla prevalenza e all'incidenza di malattia sono estremamente discordanti e sono condizionati dai criteri classificativi utilizzati nei diversi studi epidemiologici; in tal senso, il tasso di prevalenza della SjS è stimato in un range variabile tra lo 0.15% e il 3.3%, mentre il tasso di incidenza varia da 1: 1000 a 1: 100 a seconda dei diversi studi in esame (3-6). Le discrepanze degli studi epidemiologici condotti sulla malattia possono, almeno in parte essere giustificate dal fatto che criteri classificativi per la SjS primitiva e secondaria, accettati a livello internazionale, sono stati elaborati solo recentemente, nell'ambito dell' American-European Consensus Group nel 2002 (7) (Tabella 1). Utilizzando tali criteri la prevalenza della malattia è stimata pari a circa lo 0.5% nella popolazione adulta (8).

Tabella 1: *American European Consensus Criteria 2002*

| |
|---|
| 1. Sintomi oculari Una risposta positiva almeno ad una delle seguenti domande: Ha sensazione quotidiana di occhi secchi da oltre tre mesi? Ha sensazione di sabbia/corpo estraneo negli occhi? Utilizza lacrime artificiali per più di tre volte al giorno? |
| 2. Sintomi orali Una risposta positiva almeno ad una delle seguenti domande: Ha sensazione quotidiana di bocca secca da oltre tre mesi? Ha tumefazione ricorrente o persistente delle ghiandole salivari? Deve bere molto per inghiottire cibi secchi? |
| 3. Segni Oculari Schirmer test (<5 mm in 5 min) Rosa Bengala positivo |
| 4. Istopatologia Focus score > 1 (Focus: aggregato di almeno 50 cellule mononucleate adiacente ad acino intatto, Focus score numero di foci per 4 mmq) |
| 5. Impegno delle ghiandole salivari Scintigrafia salivare Scialografia parotidea Riduzione del flusso salivare (< 1,5 ml in 15 min) |
| 6. Autoanticorpi Ro-SSA e/o La-SSB |

Per SjS primario:

- Presenza di 4 criteri su sei positivi di cui almeno uno sia rappresentato dall'istopatologia o dalla sierologia
- Presenza di 3 dei 4 criteri "obiettivi" (punti 3 ,4 ,5 ,6)

Per SjS secondario: criteri 1 e 2 + almeno due tra 3, 4 e 5

Criteri di esclusione: radioterapia, HCV, AIDS, linfoma pre-esistente, sarcoidosi, GVHD, uso di farmaci anticolinergici

Dal punto di vista eziopatogenetico la SjS è descritta come un processo sequenziale “multistep” di tipo multifattoriale che sembrerebbe originare dall’interazione tra fattori di predisposizione genetica e agenti esogeni ambientali in grado di innescare risposte autoimmunitarie abnormi, sia da parte dei linfociti T che dei linfociti B, rivolte contro auto-antigeni tissutali; tali risposte sarebbero in grado di sostenere, perpetuare e amplificare il danno tissutale portando ad uno stato infiammatorio cronico e ad una progressiva perdita funzionale degli organi colpiti (2). I fattori di predisposizione genetica suggeriti sono essenzialmente rappresentati dai geni del sistema maggiore di istocompatibilità (HLA). La SjS è, infatti, strettamente associata all’espressione dell’HLA-DR3 e dei geni ad esso correlati B8 e DQ2. Tale associazione è particolarmente forte per i soggetti con SjS che producono anticorpi anti-Ro/SSA (9). Oltre al sistema HLA gli studi più recenti hanno focalizzato l’attenzione su geni polimorfici che codificano per molecole coinvolte fisiologicamente nella risposta immunitaria come il gene dell’IL-10 (aplotipo GCC), il gene del TNF alfa (allele TNF-308A) e il gene della catena alfa del recettore dell’IL4. Altri polimorfismi genici sono stati osservati a carico del gene della lectina legante il mannosio e dei recettori di alcune chemochine, in particolare del recettore CCR5 che lega le chemochine chemoattrattanti delle cellule mononucleari CCL3, CCL4 e CCL5 (10). Anche gli agenti ambientali legati alla patogenesi della SjS sono molteplici ma, in primis, sono chiamati in causa fattori ormonali (ruolo protettivo degli androgeni e pro-infiammatorio degli estrogeni che sembrerebbero contrastare l’apoptosi dei cloni linfocitari auto-reattivi) e numerosi agenti virali scialotropi come il virus di Epstein-Barr (EBV), il virus dell’epatite C (HCV) ed il retrovirus-I della leucemia umana a cellule T (HTLV-I) (10). Negli ultimi anni, il gruppo di Moutsopoulos ha identificato la presenza di RNA virale di Coxsackie virus nelle biopsie delle ghiandole salivari minori di pazienti con SjS e un’omologia di sequenza dell’87% tra un peptide derivato dalla proteina 2B dei Coxsackievirus e la regione 222-229 dell’epitopo lineare maggiore dell’auto-antigene Ro60KD, che è considerato uno degli auto-antigeni più specifici della SjS (11).

Alla luce delle più recenti acquisizioni, anche se l’eziologia della SjS rimane ancora in larga parte sconosciuta, sono stati elaborati diversi modelli patogenetici in grado di spiegare il ruolo dei diversi elementi cellulari nel danno ghiandolare che si verifica in corso di malattia. Il modello patogenetico più largamente condiviso è quello dell’“epitelite autoimmune” secondo il quale le cellule epiteliali rivestirebbero un ruolo cruciale nella formazione degli aggregati linfocitari periduttali (12). La SjS presenta, infatti, un quadro istopatologico caratterizzato da infiltrati linfocitari focali che interessano generalmente la

regione periduttale delle ghiandole esocrine ma che potenzialmente possono colpire qualunque organo e apparato (es. epitelio tubulare renale, epitelio bronchiale, epitelio dei colangioli epatici etc). Tali aggregati originano essenzialmente dalle interazioni tra le cellule epiteliali e le cellule immuni T e B. Gli aggregati linfocitari sono costituiti essenzialmente da linfociti CD4⁺ positivi che presentano essenzialmente un fenotipo memoria (CD45 RO⁺), esprimono il recettore TCR α/β e sono in grado di secernere INF- γ e IL-10. In percentuale minore sono stati evidenziati anche linfociti T CD8⁺ positivi che esprimono l'integrina (CD 103) e che si localizzano in prossimità di cellule epiteliali acinari E-caderina positive. Il rapporto CD4/CD8 a livello degli infiltrati è di 3:1-5:1. I linfociti B costituiscono solo il 20% degli infiltrati, e ancora più rari sono le cellule natural killer ed i macrofagi (complessivamente < 5%). Accanto agli infiltrati T linfocitari è possibile osservare frequentemente anche delle strutture ectopiche che sono analoghe ai centri germinativi e sono costituite essenzialmente da linfociti B, con una piccola percentuale di linfociti T e di cellule follicolari dendritiche. I linfociti B sono organizzati in una 'dark zone' centrale in attiva proliferazione (centroblasti) e in una zona più periferica 'light zone' di centrociti che vanno incontro a processi di selezione per l'espressione in superficie di anticorpi ad alta affinità. La presenza di questi centri germinativi ectopici è stata associata ad una più elevata positività di autoanticorpi anti Ro/SSA ed anti La/SSB, nonché ad un più alto rischio di trasformazione in senso linfoproliferativo (10). Secondo il "modello epitelitico" le cellule epiteliali, una volta attaccate da un ipotetico agente esogeno, si attiverebbero e inizierebbero a secernere elevate quantità di citochine pro-infiammatorie ed ad esprimere alti livelli di HLA DR richiamando in situ le cellule linfocitarie. Le cellule dell'epitelio ghiandolare fungerebbero da cellule presentanti l'antigene (APC) attivando i linfociti che potrebbero, a loro volta, interagire con i linfociti B innescando la risposta autoimmune (12). Un secondo modello proposto per la formazione degli aggregati è quello di una *disregolazione sistemica dei linfociti T circolanti*, ed in particolare dei linfociti Th1 positivi, che migrerebbero attivamente nelle ghiandole esocrine con un processo di homing mediato dall'adesione alle venule ad endotelio alto (HEV) fin dalle prime fasi di malattia. I linfociti Th1, attraverso la liberazione di citochine proinfiammatorie, ed in particolare di INF- γ , attiverebbero essi stessi le cellule epiteliali e le indurrebbero ad esprimere potenti chemoattrattanti in grado di richiamare altri linfociti e di amplificare il processo infiltrativo (13). I chemoattrattanti implicati sarebbero le chemochine, proteine a basso peso molecolare in grado di reclutare e attivare specifiche sottopopolazioni leucocitarie, modificando l'espressione e lo stato di

affinità delle molecole di adesione sulla superficie leucocitaria. Sulla scia di questa ipotesi, studi recenti hanno focalizzato l'attenzione, in particolare, su alcune chemochine INF- γ -indotte come la CXCL10 e la CXCL9, il cui mRNA è risultato up-regolato a livello delle cellule epiteliali dei dotti salivari dei pazienti con SjS rispetto ai controlli. Tali chemochine sarebbero in grado, a loro volta, di amplificare il processo richiamando ulteriori linfociti T CD3+ (14). Chemochine diverse come la CXCL13, chemoattrattanti verso i linfociti B, e il BAFF, citochina della superfamiglia del TNF, sarebbero, invece, coinvolte nella formazione delle strutture ectopiche simil germinative il cui ruolo nella successiva potenziale trasformazione linfomatosa rimane da chiarire (15). Recentemente, è stato ipotizzato, inoltre, che il ruolo dei linfociti B possa essere ancora più complesso dal momento che essi stessi sarebbero in grado di polarizzarsi, fungere da APC e produrre INF- γ , influenzando la differenziazione dei T-helper in senso T-helper 1. Questi dati porterebbero l'attenzione sui linfociti B come primi orchestratori del processo infiammatorio a carico delle ghiandole salivari (16). Comunque abbiano origine gli infiltrati linfocitari, una volta formati, essi comportano una progressiva distruzione dell'epitelio ghiandolare. Il principale meccanismo di distruzione dell'epitelio ghiandolare è rappresentato dalla morte cellulare programmata o apoptosi mediata dal sistema Fas/FasL e dal rilascio di perforina e granzima A (17). Anche se è ancora da chiarire se lo stimolo iniziale per il processo apoptotico sia intrinseco alle cellule epiteliali o sia mediato dai linfociti T, la formazione di blebs di membrana durante l'apoptosi porterebbe alla traslocazione a livello di membrana di componenti auto-antigeniche intracellulari che in questo modo guadagnerebbero l'ambiente extracellulare e potrebbero evocare la risposta auto-anticorpale. Un altro ulteriore meccanismo di esposizione di auto-antigeni endocitari sarebbe la liberazione di esosomi da parte delle cellule epiteliali ovvero di vescicole di membrana risultanti dalla fusione di endosomi e lisosomi. Tale meccanismo è stato osservato in vitro ma non ancora in vivo (2). I meccanismi patogenetici descritti giustificano, in realtà, una distruzione del 50-60% delle strutture acinari con una riserva funzionale residua del 40% (18). L'entità della compromissione della funzione secretoria è molto superiore nella SS rispetto al danno organico, e ciò ha portato ad ipotizzare che altri meccanismi siano coinvolti nella patogenesi della malattia (18). A livello del tessuto ghiandolare residuo, in particolare, alcuni autori hanno ipotizzato una disregolazione del trasporto dei fluidi, sottolineando in particolare una anomala distribuzione dei canali numero 5 dell'acquaporina nelle ghiandole salivari. Nel tessuto ghiandolare dei soggetti con SjS i canali dell'acquaporina, che regolano i movimenti dell'acqua attraverso le

membrane biologiche, sarebbero espressi non solo a livello apicale luminale ma anche a livello basolaterale determinando un ristagno interstiziale dei fluidi e contribuendo al deficit secretivo. Tale anomala distribuzione sarebbe mediata dal TNF- α e da altre citochine pro-infiammatorie prodotte localmente (19). In letteratura sono presenti dati contrastanti in questo senso; secondo altri autori, infatti, la distribuzione e la densità dell'acquaporina 5 nelle ghiandole salivari non differirebbe nei pazienti con SS rispetto ai controlli sani (20). Altri autori, negli ultimi anni, hanno indagato possibili alterazioni del circuito neurosecretorio che regola il funzionamento delle ghiandole esocrine (21). Sul parenchima ghiandolare sono presenti recettori transmembrana di tipo muscarinico, in particolare gli M3, che legano l'acetilcolina e che regolano il trasporto di ioni e di acqua attraverso le membrane cellulari nei dotti ghiandolari. Il numero dei recettori M3 eccede quello delle sinapsi neuronali ed in questo modo l'acetilcolina rilasciata da una terminazione nervosa può stimolare più acini adiacenti a quello direttamente innervato. Le alterazioni funzionali a carico del circuito neurosecretivo riguardano essenzialmente il braccio efferente del circuito, mentre quello afferente rimane integro considerando che il paziente avverte i sintomi legati alla secchezza orale e oculare. Uno dei meccanismi potenzialmente responsabili dell'iposecrezione potrebbe essere rappresentato da un ridotto rilascio di neurotrasmettitori (Ach) a livello delle giunzioni sinaptiche e/o da un'alterata risposta ai neurotrasmettitori a livello post-sinaptico. Durante il processo infiammatorio, citochine pro-infiammatorie come l'IL-1, il TNF-alfa o l'IL-6, possono interferire con il rilascio di acetilcolina da parte delle terminazioni colinergiche, inibendolo. Anche la produzione di secondi messaggeri a livello post-sinaptico è, allo stesso modo, fortemente condizionata in senso negativo dalla presenza di tali citochine, e di conseguenza le cellule ghiandolari appaiono meno responsive ai segnali efferenti (18). Infine, studi recenti hanno evidenziato un terzo meccanismo di alterazione del circuito neurosecretivo legato alla presenza di elevati livelli di anticorpi anti-M3R nei pazienti con SjS in grado di fungere da antagonisti muscarinici e di inibire la contrazione della muscolatura liscia (21). Il blocco del M3R potrebbe interferire con la secrezione ghiandolare anche contribuendo alla traslocazione dei canali dell'acquaporina (20). In conclusione la patogenesi della sindrome di Sjogren rimane ancora in larga parte da chiarire potendo essere legata sia ad un danno organico che ad un danno funzionale dei diversi parenchimi ghiandolari.

A fronte di tale complessità patogenetica il quadro clinico della sindrome di Sjogren è relativamente uniforme, essendo dominato dai sintomi legati alla secchezza delle mucose orale e oculare. Il coinvolgimento degli altri organi e apparati, seppure potenziale, si

manifesta in una minoranza dei pazienti, solitamente nelle fasi più tardive di malattia e con un'intensità clinica generalmente di tipo lieve-moderato (22). La sintomatologia oculare è caratterizzata da quadri di cheratocongiuntivite secca con ipolacrimazione, arrossamento della congiuntiva e sensazione persistente di corpo estraneo nell'occhio. Nei casi più gravi possono insorgere infezioni oculari ricorrenti e possono manifestarsi abrasioni della superficie corneale ed ulcere che possono comportare un deficit del visus (23). La sintomatologia orale è, invece, caratterizzata da una persistente xerostomia con difficoltà nella masticazione, nell'eloquio e necessità di assumere liquidi molto frequentemente. I pazienti possono riferire, inoltre, modificazioni del gusto (es. 'sensazione metallica in bocca', 'bocca amara'), tosse secca, disfagia, disagio nel portare protesi dentarie e, infine, nicturia con disturbi del ritmo sonno-veglia secondaria all'eccessiva assunzione di liquidi durante le ore diurne. Inoltre, a seconda delle casistiche, danni a carico dei processi di mineralizzazione dentaria ed alterazioni della flora microbica orale con aumento relativo dei batteri 'cariogeni' e delle diverse specie di *Candida* sono osservati fin nell'80% dei pazienti (24). All'esame obiettivo la mucosa orale appare eritematosa e asciutta e di solito si osserva la mancanza di saliva sul pavimento della bocca e/o la presenza di saliva particolarmente densa e viscosa in corrispondenza dello sbocco dei dotti delle ghiandole salivari maggiori. La superficie dorsale della lingua è spesso anch'essa arrossata e può presentare atrofia delle papille filiformi e fissurazioni laterali. In un terzo circa dei pazienti, infine, le ghiandole salivari maggiori possono presentare tumefazioni ricorrenti e bilaterali; la tumefazione delle parotidi è la più evidente ma spesso è preceduta da quella delle ghiandole sottomandibolari che, tuttavia, può essere misconosciuta (25). Nell'ambito delle manifestazioni sistemiche la malattia può potenzialmente colpire tutti gli organi e gli apparati. La tabella 2 riassume i principali quadri clinici descritti in letteratura e la loro prevalenza. La complicanza più temibile della malattia è tradizionalmente considerata l'insorgenza di una malattia linfoproliferativa e, in particolare, di un linfoma non Hodgkin a cellule B, che generalmente è un linfoma di basso grado della zona marginale. In realtà, ad oggi, studi trasversali hanno evidenziato come solo il 4% dei pazienti con SjS presenti tale complicanza ed il solo studio prospettico longitudinale che ne ha valutato l'incidenza, ha evidenziato come il 7% di pazienti con SjS abbia sviluppato tale affezione in un follow-up di cinque anni (26, 27). Tuttavia, analizzando le possibili cause di morte nei soggetti con SjS, non si evidenziano differenze statisticamente significative rispetto alla popolazione generale, se non per il rischio legato proprio alle complicanze linfoproliferative che sono responsabili di un eccesso di mortalità pari a 2.53 per 1000

persone-anno (8). Uno studio multicentrico europeo, condotto su 33 pazienti seguiti in 9 centri, ha, pertanto, recentemente cercato di mettere in evidenza le caratteristiche del subset di pazienti a rischio per linfoma, identificando nella presenza di linfadenopatia, vasculite cutanea, ipocomplementemia, coinvolgimento del sistema nervoso periferico, febbre, anemia e linfopenia potenziali fattori predittivi per una prognosi negativa (28). Fatta eccezione per le complicanze linfomatose, la SjS si presenta, invece, in conclusione, come una malattia a carattere relativamente favorevole e scarsamente aggressiva, anche se a decorso lentamente progressivo, nella quale la qualità di vita dei pazienti è condizionata essenzialmente dalla sintomatologia ghiandolare (29).

Tabella 2: Manifestazioni extraghiandolari e prevalenza

| Apparato/Organo | Quadri clinici | Prevalenza |
|------------------------|---|-------------------|
| Muscoloscheletrico | Artralgie | 60-70% |
| | Artrite | 10-20% |
| | Mialgie | 30-50% |
| Cardiovascolare | F. di Raynaud | 15%-35% |
| Respiratorio | Xerotrachea | 20%-25% |
| | Afezioni bronchiolari di tipo ostruttivo | 20%-33% |
| | Interstiziopatia polmonare (clinica e subclinica) | 8%-35% |
| Genito-urinario | Nefropatia tubulointerstiziale | 15%-20% |
| | Glomerulonefrite | 2%-5% |
| | Dispareunia | 10%-30% |
| Gastroenterico | Disfagia | 25-30% |
| | Epatopatia autoimmune | 5% |
| Cute | Vasculite cutanea | 10% |
| | Xerosi cutanea | 23%-68% |
| ORL | Ipoacusia | 27% |
| Ematologico | Anemia | 18% |
| | Leucopenia | 18% |
| | Linfopenia | 9% |
| SNP | Multinevrite sensitivo motoria | 2-10% |
| | Neuropatia autonoma | ? |
| Endocrino | Tireopatia | 30% |

Dal punto di vista dei dati di laboratorio, nella SjS, gli esami ematochimici routinari possono documentare un'ipergammaglobulinemia policlonale (80%) ed un rialzo della velocità di eritrosedimentazione in presenza di valori normali o solo modificamente alterati della proteina C reattiva (10). La SjS è caratterizzata anche da un ampio spettro di autoanticorpi non organo specifici che comprendono: anticorpi antinucleari (80%), fattore reumatoide (60-90%), anticorpi anti-Ro/SSA (60-80%) e anti-La/SSB (40-60%). La positività del fattore reumatoide si riscontra in media nel 60% dei soggetti ma una caratteristica peculiare della SjS è che, mentre nel siero è presente il fattore reumatoide di

classe IgM, nella saliva, invece, è evidenziabile un fattore reumatoide di tipo IgA, probabilmente prodotto localmente a livello ghiandolare (10). Gli anticorpi anti-Ro/SSA e anti-La/SSB sono considerati i più specifici per la SjS e fanno parte dei criteri classificativi per la malattia (7). Inoltre, gli anti-Ro/SSA sembrano correlare con l'impegno cutaneo vasculitico mentre gli anti-La/SSB con la tumefazione parotidea ed in genere con l'impegno extraghiandolare sistemico (30, 31). I bersagli antigenici degli anticorpi anti-Ro/SSA e anti-La/SSB sono costituiti da complessi ribonucleoproteici, fisiologicamente localizzati a livello citoplasmatico (70%) o intranucleare (30%). Sono descritte due proteine diverse di tipo Ro: una di 52 kDa e una di 60 kDa, mentre è nota una sola proteina di tipo La di 48 kDa. Il complesso ribonucleoproteico è costituito da RNA a basso peso molecolare (28 - 38 kDa) cui si possono fissare direttamente la proteina Ro 60 kDa (all'estremità 5') o la proteina La 48kDa (all'estremità 3'). La proteina Ro 52 kDa si fissa indirettamente all'RNA utilizzando come intermediario la Ro 60 kDa. La funzione delle molecole Ro e La rimane ancora in larga parte sconosciuta. La proteina La/SSB parteciperebbe ai fenomeni di trascrizione del DNA e nella fattispecie al complesso dell'elicasi ATP dipendente per la formazione dell'ibrido RNA/DNA; inoltre essa interverrebbe nella maturazione e nell'esportazione nel citoplasma dei trascritti dell'RNA polimerasi III. La Ro/SSA favorirebbe invece il trasporto dell'RNA dal nucleo al citoplasma. Nel nucleo la Ro 52 è fissata ad alcuni motivi del DNA e fungerebbe da regolatrice dell'espressione genica; la Ro 60, invece, inibirebbe la trascrizione operata dall'RNA polimerasi III (32). Nell'ambito dell'ampio spettro di autoanticorpi descritti un ruolo ancora controverso sembra essere svolto dagli anticorpi anti- α -fodrina. L' α -fodrina è una proteina di 240kDa che appartiene al citoscheletro cellulare e che è stata identificata in tutte le cellule, incluse quelle dei tessuti ghiandolari. Anticorpi anti- α -fodrina di classe IgG o IgA sono stati evidenziati sia nei modelli murini di SjS che nei pazienti con SjS in percentuali variabili tra il 52% e il 93%. Ad oggi, il significato clinico di questi autoanticorpi rimane ancora da chiarire anche se, poichè l' α -fodrina è associata con pompe e canali ionici di membrana, è stato ipotizzato che gli autoanticorpi anti- α -fodrina possano interferire con il funzionamento delle suddette pompe e quindi con la funzione secretoria delle ghiandole (33).

La diagnosi di SjS si basa sulla combinazione di elementi clinici, sierologici, strumentali e istologici. L'iter diagnostico prevede che la sintomatologia soggettiva del paziente relativa alla secchezza degli occhi e della bocca venga registrata mediante questionario validato

(34). Per l'obiettivazione di tale sintomatologia sono utilizzati test oculari per lo studio del film lacrimale (Test di Schirmer e Rosa Bengala) e test di valutazione morfologica e funzionale delle ghiandole salivari maggiori, quali la scialometria, la scialografia e la scintigrafia salivare. In particolare, il test di Schirmer consente di misurare la secrezione lacrimale utilizzando strisce di carta bibula poste nel fornice congiuntivale inferiore per 5 minuti. Il test è positivo se dopo 5' sono bagnati < di 5 mm della striscia di carta bibula. Il Rosa Bengala, oggi sostituito dal verde di lissamina, è, invece, un colorante specifico per cellule devitalizzate e mucina che, in presenza di un danno dell'epitelio congiuntivale o corneale, si fissa sulle cellule rendendo visibili le lesioni epiteliali (23). Dei test di valutazione delle ghiandole salivari maggiori, la scialometria consente di misurare il flusso salivare (patologico se < a 1,5 min /15 minuti), la scialografia di osservare l'architettura e la configurazione del sistema duttale e, infine, la scintigrafia permette una valutazione funzionale delle ghiandole salivari attraverso la velocità di captazione del pertecnato di sodio marcato con Tc 99m (25). Un ausilio per la diagnosi può essere fornito anche dagli esami di laboratorio ed in particolare dalla ricerca degli autoanticorpi anti-Ro/SSA e anti-La/SSB che sono gli unici inclusi nei criteri classificativi internazionali (7). Nell'algoritmo diagnostico, però, la biopsia delle ghiandole salivari minori rappresenta l'indagine "gold standard" ed è universalmente considerata come il criterio più specifico per la diagnosi di SjS (82-95%) (35). La sensibilità dell'esame è più bassa (75-83%) e la percentuale dei falsi negativi è intorno al 20% (36). L'esame viene effettuato praticando una incisione di 1,5-2 cm tra la linea mediana e la commissura della mucosa buccale del labbro inferiore. L'incisione viene effettuata su mucosa integra e le ghiandole prelevate, una volta incluse in formalina, vengono sottoposte all'attenzione del patologo (25). Allo studio istopatologico la ghiandola può mostrare un diverso grado scialoadenite (37, 38). Una scialoadenite aspecifica di grado lieve o moderato non è considerata sufficiente per la diagnosi di SjS, mentre un quadro di scialoadenite focale con almeno un cluster di 50 linfociti per 4 mm² di tessuto (focus) è compatibile con la diagnosi di malattia, anche in accordo con i criteri internazionali (7). Una distribuzione linfocitaria periduttale è inoltre considerata tipica delle forme di SjS primitivo, mentre la distribuzione perivascolare caratterizza prevalentemente le forme di SjS secondaria (38). L'esame istologico delle ghiandole salivari minori non è esente da limiti. Essi sono legati alla sua invasività, all'andamento fluttuante del grado di infiltrazione nelle ghiandole nonché alla necessità di prelevare un campione di tessuto sufficientemente grande considerando la variabilità inter-ghiandolare dell'infiltrato. Un altro limite dell'esame è la riproducibilità del risultato che è in parte

condizionata dall'area ghiandolare esaminata e dalla qualità tecnica del materiale (36). In conclusione, ad oggi non sono stati identificati biomarkers specifici per la diagnosi di SjS, in grado di permettere di formulare ipotesi prognostiche in merito al suo decorso. Anche se la malattia ha un carattere generalmente benigno, tuttavia, considerando il potenziale rischio linfoproliferativo, è auspicabile che possano essere disponibili mezzi diagnostici sempre meno invasivi e più specifici per la SjS.

Ib. SjS: Modificazioni qualitative e quantitative nella composizione della saliva

La SjS, attraverso il sovvertimento strutturale progressivo delle ghiandole salivari e le alterazioni dei processi riassorbitivi e secretivi, determina una riduzione del flusso salivare e può indurre svariate modificazioni della composizione della saliva stessa.

La valutazione quantitativa del flusso salivare viene effettuata, in accordo con i criteri classificativi internazionali, mediante scialometria basale considerando suggestivi di malattia valori uguali o inferiori a 1.5 ml/15 min (7). In realtà, un recente studio olandese ha evidenziato come la riduzione del flusso salivare sia legata, inizialmente, solo ad una riduzione del flusso delle ghiandole sottomandibolari e sottolinguali e come, solo in una fase più avanzata di malattia, si verifichi anche il coinvolgimento delle parotidi (39). In pratica vi sarebbe una progressione temporale nel coinvolgimento delle ghiandole salivari maggiori con l'interessamento, prima, delle sottomandibolari e delle sottolinguali e, dopo, delle parotidi. Lo stesso studio ha confermato come, nella storia naturale della malattia, la composizione della saliva subisca dei cambiamenti con un aumento della concentrazione assoluta del cloro e del sodio e una riduzione dei fosfati. Questi dati confermano studi biochimici precedenti che, fin da metà degli anni '80, hanno iniziato a descrivere come nella saliva dei pazienti con SjS vi fosse un aumento della concentrazione del sodio e del cloro e anche delle proteine totali, dell'albumina, delle IgG e delle IgA (40, 41). Parallelamente, però, è emerso che, anche se la concentrazione assoluta di tali soluti è aumentata, il loro output/minuto è in realtà ridotto e questo dato sarebbe quello in maggior misura responsabile delle alterazioni del cavo orale descritte in corso di malattia (42). Progressivamente, nel tempo, sono state descritte anche ulteriori modifiche a carico della lattoferrina e della beta-2-microglobulina, del lisozima, delle metalloproteinasi MMP-2 e MMP-9 e della callicreina che risulterebbero aumentate, nonché sono state osservate una riduzione nell'attività dell'amilasi e una riduzione del pH salivare (43-47). Gli studi biochimici finora condotti sulla saliva dei pazienti con SjS non sono completamente confrontabili e omogenei. Il principale limite è legato alla difficoltà nel reperire da tutti i pazienti un quantitativo di saliva sufficiente per poter studiare i diversi analiti. Per ovviare ai problemi della raccolta salivare molti studi sono stati condotti su flusso salivare stimolato o selettivamente prelevato da alcune ghiandole, generalmente le parotidi. La stimolazione consente di ovviare al limite del reperimento del campione, tuttavia, l'aumento del flusso può influenzare la concentrazione di alcune proteine che possono risultare ridotte e modificare il pH salivare, aumentandolo. La valutazione del solo flusso

parotideo, inoltre, può fornire risultati parziali in considerazione dell'apparente impegno più tardivo, da parte della malattia, delle parotidi rispetto alle sottomandibolari e alle sottolinguali (39). I parametri oggi ritenuti più sensibili (0.85) e specifici (0.96) sono la combinazione del flusso sottomandibolare e sottolinguale stimolato e la valutazione della concentrazione salivare parotidea del sodio e del cloro (48). Complessivamente, ad oggi, la scialometria e gli studi biochimici condotti sulla saliva risultano in larga parte poco confrontabili, scarsamente riproducibili e di dubbia utilità diagnostica. E' verosimile che la possibilità identificare specifici biomarkers a livello salivare, espressi in maniera diversa nei pazienti rispetto ai controlli, e negli stessi pazienti a seconda dell'attività di malattia, possa consentire di ottenere uno strumento diagnostico non invasivo di indubbia utilità nella cura della SjS; da qui il crescente interesse verso studi di proteomica volti a caratterizzare il profilo proteico della saliva dei pazienti con SjS, valutando simultaneamente un ampio numero di proteine e a partire da minime quantità di fluido salivare dell'ordine di microlitri.

Ic. La proteomica

Il termine “proteomica”, coniato in analogia con il vocabolo genomica nel 1995, indica lo studio di tutte le proteine espresse da un organismo, tessuto o cellula in un preciso istante. (49). Il proteoma è un’entità dinamica perché non solo cellule di uno stesso organismo esprimono proteine differenti, ma anche lo stesso tipo di cellula, in condizioni diverse (età, malattia, ambiente), è caratterizzato da proteine diverse (49). L’analisi diretta delle proteine, rispetto ad un approccio genomico, consente, quindi, di ottenere informazioni precise sui livelli delle proteine presenti, in quel momento, in una cellula o in un fluido biologico rilevandone, inoltre, le possibili modificazioni post-traduzionali (come ad esempio la fosforilazione), che determinano la funzione delle proteine e che risultano particolarmente importanti nella trasduzione del segnale (50, 51).

Negli ultimi anni la proteomica è progredita con crescente interesse nel mondo scientifico e, al momento, è usata come un moderno strumento nella scoperta di farmaci, per la determinazione di processi biochimici implicati nelle malattie, per monitorare processi cellulari, per caratterizzare sia i livelli di espressione che le modifiche post-traduzionali delle proteine, per ricercare differenze tra fluidi biologici o cellule di soggetti sani e malati e per identificare markers di una malattia e possibili candidati per l’intervento terapeutico (52).

Gli studi di proteomica vengono tradizionalmente distinti in tre aree: la *proteomica funzionale* che permette la caratterizzazione dell’attività, delle interazioni e della presenza di modificazioni post-traduzionali delle proteine, per la descrizione a livello molecolare dei meccanismi cellulari; la *proteomica d’espressione* che fornisce la descrizione dell’intero proteoma di una cellula, organismo o tessuto; la *proteomica strutturale* che ha l’obiettivo di identificare e mappare le proteine presenti a livello degli organuli cellulari chiarendone le interazioni reciproche (52).

Le tecnologie proteomiche, a causa della diversità delle proteine, sono le più varie e integrano metodi biologici, chimici ed analitici; la principale tecnologia utilizzata è, però, la spettrometria di massa (MS) che viene associata a metodi differenti di separazione delle proteine (53, 54). La MS è una tecnica altamente sensibile e versatile per lo studio delle proteine e la combinazione della MS, per l’identificazione proteica, con l’elettroforesi bidimensionale (2-DE), come tecnica separativa ad alto potere risolutivo, è il metodo classico e più utilizzato (52).

L'elettroforesi bidimensionale (2-DE) consente di separare, visualizzare, quantificare ed identificare centinaia di proteine a seconda del loro punto isoelettrico e peso molecolare, in un singolo gel, partendo da campioni di complesse miscele proteiche estratte da cellule, tessuti o altri campioni biologici.

La tecnica, introdotta nel 1975, separa le proteine in due step distinti (Fig.1):

1) la 1° dimensione, *Iso-Elettro Focusing (IEF)*, separa le proteine secondo il loro punto isoelettrico (pI).

2) la 2° dimensione, l'*elettroforesi su gel di poliacrilammide (SDS-PAGE)*, separa le proteine secondo il peso molecolare (PM).

Con la 2-DE si possono separare migliaia di proteine, anche quelle che differiscono per un solo amminoacido o per piccole differenze di pI e/o PM, ed ogni spot ottenuto corrisponde ad una singola specie proteica. Per una buona elettroforesi bidimensionale è essenziale un'adeguata preparazione dei campioni: il processo dovrà risultare in una completa solubilizzazione, disaggregazione, denaturazione e riduzione delle proteine del campione. Per la strategia di preparazione dei campioni è importante considerare lo scopo dello studio, infatti step addizionali possono aumentare la qualità del risultato finale, ma portano anche alla perdita di proteine (55).

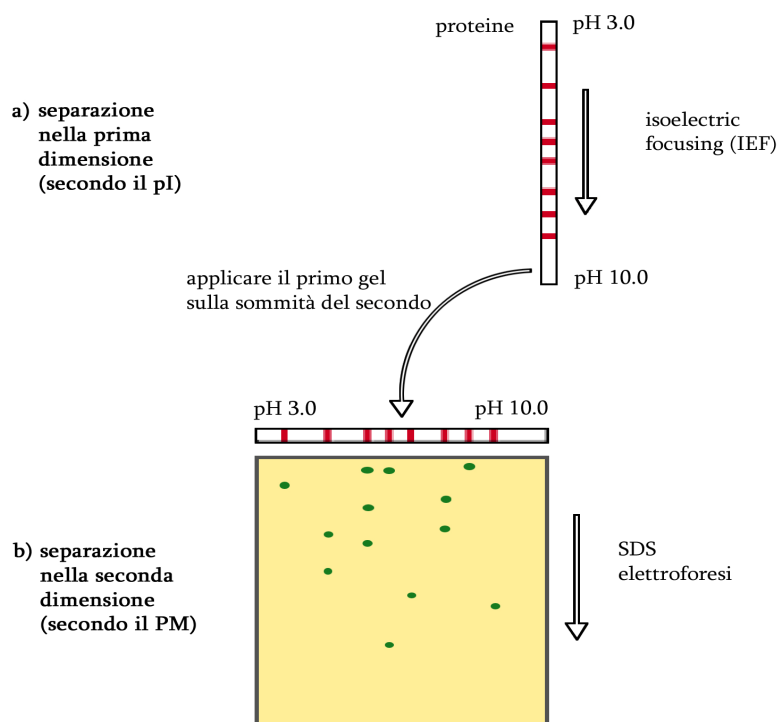


Fig. 1: Elettroforesi bidimensionale.

Prima dimensione

L'IEF è un metodo elettroforetico che separa le proteine secondo il loro punto isoelettrico (pI) utilizzando come supporti delle strip di gel di poliacrilammide. Le proteine sono molecole anfotere: presentano carica netta positiva, negativa o nulla a seconda del pH dell'ambiente in cui si trovano: sono cariche positivamente a pH minori del loro pI e negativamente a pH maggiori. Il punto isoelettrico è il valore di pH al quale la carica netta della proteina è zero. In un gradiente di pH, sotto l'influenza di un campo elettrico, le proteine si muovono fino alla posizione nel gradiente alla quale la loro carica netta è nulla; ad esempio una proteina con carica positiva migrerà verso il catodo, riducendo progressivamente la sua carica positiva, mentre si muove attraverso il gradiente, finché non raggiunge il suo pI. Questo è l'effetto focusing dell'IEF, che concentra le proteine ai loro pI e permette di separarle sulla base di piccole differenze di carica.

La risoluzione del campione è determinata dall'ampiezza del gradiente di pH e dalla forza del campo elettrico. Si utilizzano comunemente voltaggi alti (oltre 1000 V): quando le proteine hanno raggiunto la posizione finale nel gradiente di pH, nel sistema c'è un piccolo movimento ionico che risulta in una corrente finale molto bassa (sotto 1 mA).

L'IEF effettuato in condizioni denaturanti dà la più alta risoluzione ed i risultati migliori.

Originariamente il metodo prevedeva l'utilizzo di tubi di gel di poliacrilammide con gradienti generati da miscele di anfoliti, piccoli polimeri anfoteri che, sotto l'influenza di un campo elettrico, migrano e si allineano secondo i pI, dando un gradiente continuo (Klose J. 1975). A causa delle limitazioni e dei problemi di questi supporti, sono stati sviluppati dei gel a gradiente di pH immobilizzato (IPG), creati incorporando covalentemente un gradiente di gruppi acidi e basici nel gel di poliacrilammide (57). Per le strip sono utilizzate molecole ben caratterizzate, monomeri di acrilammide legati ognuno ad un singolo gruppo basico o acido. Le strip IPG sono prodotte su supporti in plastica usando due soluzioni: una miscela acida ed una basica di monomeri di acrilammide (entrambe contenenti inoltre bisacrilammide e catalizzatori). Le concentrazioni dei gruppi nelle due soluzioni determinano il range di pH del gradiente prodotto (Fig. 2). I gel sono poi lavati, disidratati e tagliati a strisce. In commercio si trovano strip (Amersham Biosciences, Sigma, etc.) di varie lunghezze (7-11-13-18-24 cm) e con vari intervalli di pH (3-10; 4-7; 6-11; 6-9; 3,5-4,5; etc), lineari (L) e non lineari (NL). L'uso delle strip IPG aumenta la riproducibilità e la qualità dei risultati (58).

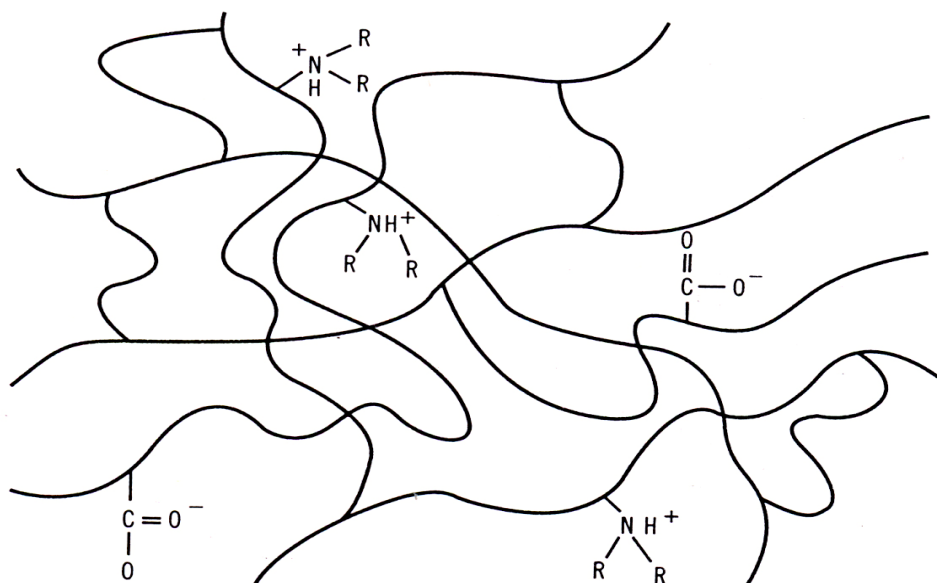


Fig. 2: Rappresentazione grafica della matrice del gel di poliacrilammide con legati i gruppi acidi e basici.

Seconda dimensione

All'IEF segue l'SDS-PAGE, una tecnica elettroforetica che separa i polipeptidi secondo la massa molecolare, utilizzando gel di poliacrilammide. Il sodio dodecil solfato (SDS) è un detergente anionico che in soluzione acquosa stabilizza le molecole proteiche denaturate formando attorno ad esse un guscio di solvatazione (1,4 g SDS/g proteine) che genera micelle dotate della stessa carica elettrica. In questo modo la specifica carica elettrica di una catena polipeptidica viene mascherata dalle cariche negative presenti sulle micelle formate dalle molecole di SDS ed ogni aggregato solubilizzato, proteina-SDS, viene a presentare identica carica negativa per unità di massa. Le particelle anioniche si spostano nel gel di acrilammide, che agisce da setaccio molecolare, separandosi in base al loro peso molecolare mentre migrano in direzione dell'anodo (55).

Per la *visualizzazione dei risultati* possono essere utilizzati molti metodi e le caratteristiche richieste sono: alta sensibilità, ampio range di quantificazione, compatibilità con la spettrometria di massa, bassa tossicità. I metodi più comunemente utilizzati sono il SILVER STAINING o colorazione argentea che è un processo multi-step a vari reagenti molto sensibile (1 ng) o il COOMASSIE STAINING (55). Questo ultimo è circa 50-100 volte meno sensibile (30-50 ng) della colorazione all'argento ma è il solo compatibile con la successiva MS (59).

Le immagini dei gel vengono poi acquisite tramite scanner ed analizzate al computer con software appositi per analizzare complessi campioni proteici separati con l'elettroforesi bidimensionale: un esempio è il software Amersham Biosciences ImageMaster TM 2D Platinum Elite. E' così possibile individuare proteine mancanti o modificate, quantificare gli spot proteici e valutare i cambiamenti nell'espressione proteica in diversi campioni (come controlli vs patologici) (60).

Gli spots proteici di interesse possono essere ulteriormente caratterizzati mediante **spettrometria di massa (MS)**. Uno spettrometro di massa è uno strumento analitico in grado di misurare la massa molecolare di una molecola dopo che essa sia stata ionizzata, ossia dopo che gli sia stata impartita una carica elettrica. Esso è infatti in grado di separare gli ioni molecolari in base al loro rapporto massa/carica. La formazione di ioni di campione in fase gassosa è un prerequisito essenziale per i processi di separazione e di rivelazione tipici di uno spettrometro di massa (61, 62). Esistono molte sorgenti di ionizzazione, ma le più usate nel campo dei peptidi e delle proteine sono la sorgente **MALDI** (matrix-assisted laser desorption/ionization), SELDI (surface enhanced laser desorption/ionization) e la sorgente ESI (elettrospray ionization) (63). La sorgente MALDI, la cui messa a punto risale alla fine degli anni '80, rappresenta una tecnica di ionizzazione "soft" e quindi applicabile a molecole grandi, non volatili o termicamente poco stabili. La tecnica di ionizzazione del MALDI è detta per desorbimento ed è un processo in cui una molecola viene sia evaporata da una superficie che ionizzata. Il campione viene miscelato ad una matrice (di solito acidi organici non volatili, in modo da ottenere un rapporto matrice/campione pari a 10.000:1) e posto, quindi, su un supporto di acciaio dove viene lasciato cristallizzare. La superficie del campione viene bombardata con fotoni ad alta energia derivanti da un raggio laser pulsato (λ 337 nm). L'impatto deposita energia sul campione, direttamente o mediante la matrice, e porta al trasferimento delle molecole campione in fase gassosa ed alla loro ionizzazione. Nel MALDI si assiste ad una ionizzazione per protonazione ossia le molecole catturano protoni caricandosi positivamente (fig 3) (63). La tecnica SELDI, utilizzata a partire dagli anni '90, consente di separare gli analiti in base alla carica di superficie ed è particolarmente utile nell'identificare ioni di bassa massa e di carica basica. Nella ionizzazione per elettro-nebulizzazione (ESI), infine, gli ioni si formano da soluzioni che vengono finemente nebulizzate attraverso un capillare tenuto ad alto potenziale elettrico. Gli ioni dell'analita, nelle goccioline cariche, vengono volatilizzati in seguito alla rimozione del solvente per

evaporazione e diretti, attraverso un sistema di trasferimento ionico, all'analizzatore di massa (64).

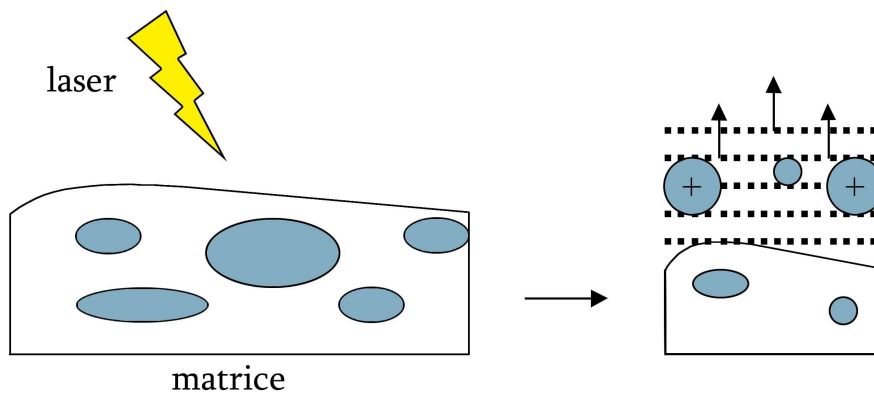


Fig. 3 : MALDI

Una volta ionizzate, le molecole vengono identificate in base al rapporto massa/carica. Il tipo di analizzatore di massa che viene maggiormente usato per l'approccio proteomico classico è il **TOF** (time of flight). Il TOF è essenzialmente costituito da un tubo di lunghezza l nota dove vi è assenza di campo elettrico, ma un'elevata condizione di vuoto. Il vuoto è necessario per permettere agli ioni di raggiungere il detector senza collidere con altre molecole gassose. Queste collisioni potrebbero ridurre la risoluzione e la sensibilità dello strumento e provocare frammentazioni degli stessi ioni. Nel MALDI-TOF un impulso laser desorbe e ionizza le biomolecole. Gli ioni vengono accelerati tramite un voltaggio elevato, acquisendo una velocità che dipende dalla massa: gli ioni leggeri acquisiscono una velocità più elevata rispetto a quelli più pesanti. Entrando in una regione priva di campo elettrico ogni ione mantiene una velocità costante fino a che non raggiunge il rivelatore. Gli ioni di massa differente possono quindi essere separati secondo il tempo: gli ioni più pesanti impiegano più tempo di quelli leggeri. Rilevando il numero degli ioni che arrivano a tempi diversi, è possibile calcolare e visualizzare uno spettro di massa del campione nel quale sono presenti picchi diversi che rappresentano la composizione in ioni con un diverso rapporto massa/carica. Poiché lo stato di carica è solitamente di +1, negli esperimenti di MALDI, è possibile identificare i picchi come rappresentativi delle masse (Fig 4).

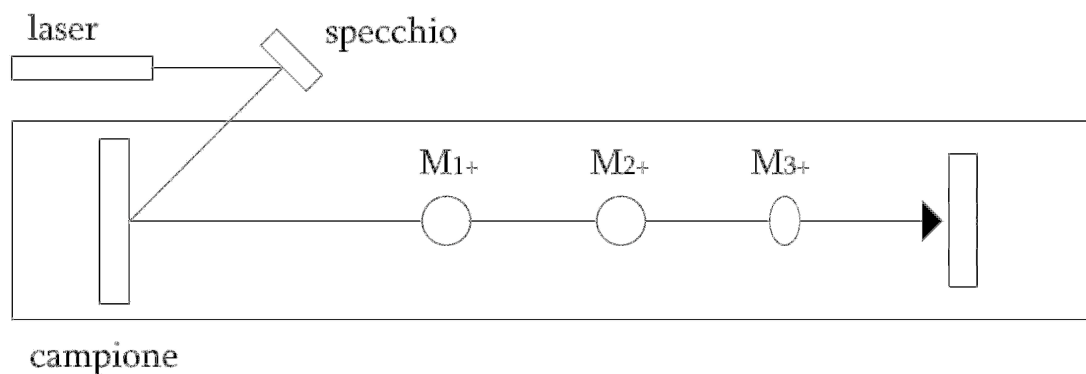


Fig. 4: MALDI-TOF

La MS crea una lista di massa dai peptidi analizzati. Tale lista di massa dei peptidi sconosciuti viene comparata con un database, costituito da proteine note. Comparando la lista di massa dei peptidi della proteina sconosciuta con le liste di massa dei peptidi noti presenti nel database viene effettuata l'identificazione (64) La quantità minima di campione necessaria per l'analisi dipende dalla purezza del campione e di solito è nell'ordine di poche picomoli.

Il vasto range di massa letto, tra 1 e 300 kDa, l'alta accuratezza e la sensibilità rendono il MALDI un metodo d'elezione per l'analisi di tutti i tipi di biomolecole (proteine, acidi nucleici, carboidrati) (65).

In combinazione con l'elettroforesi bidimensionale (e con i database di proteine) il MALDI è particolarmente utilizzato per l'identificazione di spot proteici attraverso 2 approcci principali: la *peptide-mass fingerprinting* (analisi della massa dei digeriti proteolitici) o la *peptide sequencing* (66).

I campioni, di solito, sono separati su un gel e gli spot proteici di interesse sono tagliati e trattati con tripsina, un enzima in grado di rompere i legami peptidici in cui è coinvolto un residuo di arginina o lisina; la miscela di frammenti proteici (peptidi) ottenuta dopo digestione enzimatica è purificata e sottoposta ad analisi di massa. La massa dei peptidi può essere misurata con maggior precisione rispetto a quella delle proteine intatte: i peptidi danno origine ad una library di masse molecolari derivate direttamente dalle proteine, che possono essere identificate con tecniche computazionali e tramite l'utilizzo di database (67). Se la proteina non risulta presente nei database, è possibile ottenere informazioni sulla sequenza dal MALDI con un protocollo di degradazione di Edman modificato: questo è un metodo comune per l'analisi della sequenza delle proteine, che utilizza ripetuti cicli di

rottura dei singoli amminoacidi dal terminale amminico (tramite peptidasi) e successiva identificazione degli amminoacidi staccati con cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC). La miscela di peptidi è analizzata e la sequenza codificata tramite differenze di massa (peptide ladder sequencing) (Fig. 5).

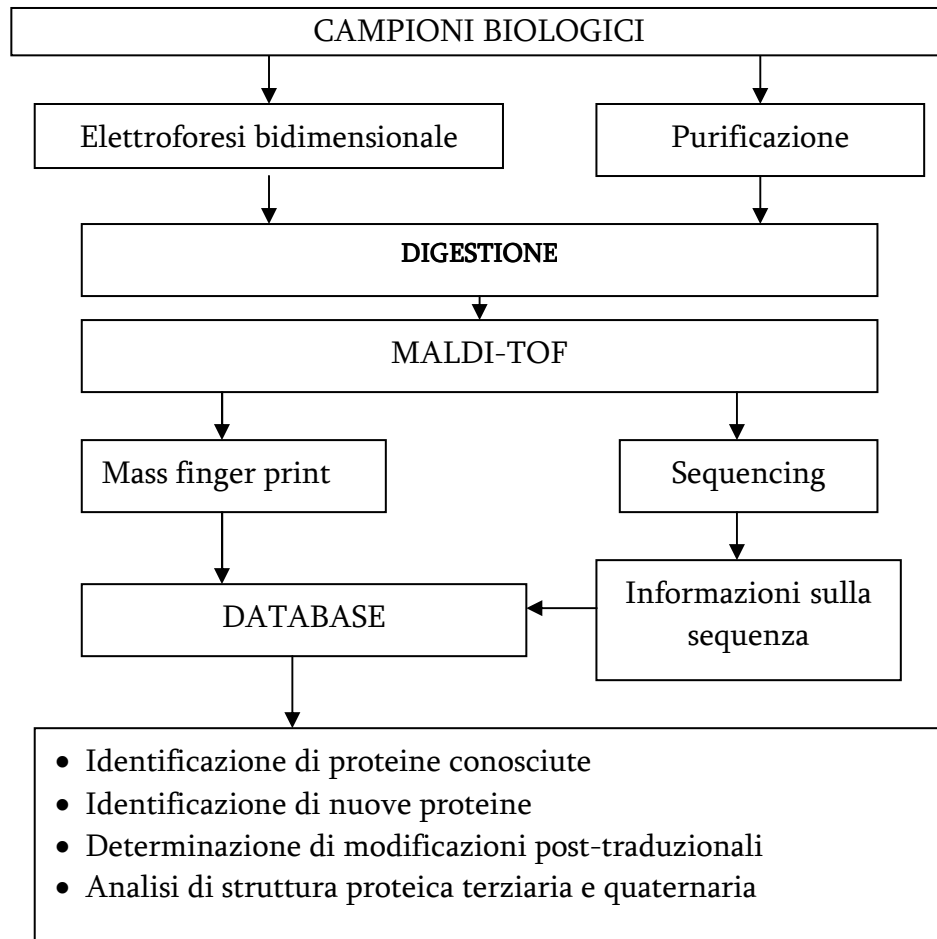


Fig. 5: Schema per l'identificazione di proteine.

Id. Applicazioni cliniche dell'analisi proteomica allo studio della saliva

La saliva in condizioni fisiologiche svolge alcune funzioni fondamentali come: lubrificare e pulire i tessuti orali facilitando il linguaggio, la deglutizione e l'ingestione di cibi; mantenere l'omeostasi nella cavità orale attraverso i tamponi carbonato e fosfato; rimineralizzare i denti con calcio e fosfato; proteggere la superficie dei denti e delle mucose attraverso un'importante azione antimicrobica (lisozima, cistatine, immunoglobuline, lactoferrina, istatine); iniziare la digestione degli amidi grazie all'amilasi salivare (68). La saliva è costituita per il 90% dai fluidi secreti dalle ghiandole salivari maggiori (parotidi, sottomandibolari, sottolinguali) e minori (si trovano nel labbro inferiore, lingua, palato, guance e faringe) e per un 10% è rappresentata dal fluido gengivale crevicolare. La sua composizione è caratterizzata principalmente da acqua (99%), elettroliti ma anche proteine di varia natura (enzimi, mucine, immunoglobuline) (68).

L'analisi della saliva, rispetto ad altri fluidi biologici, offre alcuni vantaggi come il fatto che possa essere raccolta in modo non invasivo da personale con preparazione limitata e senza particolari attrezzature, facilmente anche da pazienti meno collaboranti (bambini, anziani, insufficienti mentali) e che possa fornire un approccio poco costoso per lo screening di grandi popolazioni. I limiti dell'analisi salivare sono, viceversa, rappresentati dall'alta concentrazione di mucine, di residui e di batteri nonché dalla sua alta attività proteolitica (69). La raccolta di saliva direttamente dalle ghiandole che la producono può essere utile per individuare patologie specifiche delle ghiandole, ma oggi, sempre più frequentemente, nella diagnosi delle malattie sistemiche, è la saliva presente nel cavo orale che viene più frequentemente utilizzata; tale utilizzo è in larga parte giustificato dal fatto che la saliva del cavo orale contiene alcuni costituenti del siero che raggiungono le ghiandole salivari per diffusione passiva, per ultrafiltrazione attraverso le giunzioni intracellulari o attraverso il flusso del fluido gengivale (70). Certamente i livelli di certi costituenti serici nella saliva non sono sempre un riflesso dei livelli di questi markers nel siero, ma c'è un crescente interesse nell'uso della saliva e soprattutto nello studio delle proteine salivari per scopi diagnostici, specie nel caso di malattie sistemiche ereditarie, autoimmuni, infettive, nelle neoplasie del cavo orale e per le malattie virali, nonché anche per monitorare i livelli di farmaci, sostanze d'abuso ed ormoni (70, 71). In questo senso, è stato ipotizzato che nella fibrosi cistica, ad esempio, l'antigene carcinoembrionario o la glicosilazione di alcune mucine salivari possano fungere da biomarkers di malattia mentre,

nei pazienti con diabete mellito, la concentrazione salivare di amilasi e IgA salivari risultino aumentate (72).

Negli ultimi cinque anni la ricerca dei biomarkers salivari di malattia è stata potenziata grazie alla tecnologia proteomica che ha permesso di mappare le proteine presenti nella saliva dei soggetti sani analizzando sia il fluido salivare in toto (69, 72-74) che la pellicola salivare adesa ai denti (75), il fluido creviculare (76) e, infine, anche i secreti ghiandolari selettivamente prelevati dalle parotidi, dalle sottomandibolari e dalle sottolinguali (77,78). Il confronto tra il pattern proteico salivare dei soggetti sani e dei malati sta consentendo di rilevare livelli di proteine specifiche che potrebbero essere usati come biomarkers di malattia. E' possibile ipotizzare, con tale approccio, di poter fornire anche informazioni riguardo variazioni semiquantitative sui livelli specifici di ciascuna proteina e rilevare la presenza di isoforme dovute a modificazioni post-traduzionali come fosforilazioni e glicosilazioni. Analisi in questo senso sono già state effettuate per il lichen planus, per alcune neoplasie del cavo orale e della testa e sono in corso per numerose malattie sistemiche (79, 80). Un lavoro preliminare è stato recentemente pubblicato anche per la SjS ma limitatamente all'analisi del secreto parotideo stimolato (81). Questo lavoro, che si colloca nel più ampio panorama delle recenti applicazioni della proteomica allo studio delle malattie reumatiche (Tabella 3), ha messo in luce importanti differenze qualitative e quantitative nei pazienti con SjS evidenziando, in particolare, la riduzione dell'amilasi e della carbonato deidrogenasi e l'aumento dei livelli di alcune proteine come la beta-2-microglobulina, il lisozima C, la cistatina C, la catena immunoglobulinica leggera Igk e il recettore polimerico delle IgG. Alla luce dei risultati incoraggianti finora ottenuti, lo studio delle proteine salivari sembra poter aprire nuovi sbocchi e nuove potenzialità per la ricerca sulle malattie reumatiche, specie nel caso di malattie come la SjS che colpiscono elettivamente le ghiandole salivari.

Tabella 3: *Analisi Proteomica in Reumatologia*

| Malattia | Autore | Materiali |
|---|--------------------------------|---------------------------|
| Osteoartrite | Hermansson M. et al. 2004 (82) | Cartilagine patologica |
| Osteoartrite | De Ceuninck F et al. 2005 (83) | Cartilagine patologica |
| Osteoartrite | Ruiz-Romero C et al. 2005 (84) | Cartilagine patologica |
| Artrite Reumatoide | Sinz A. et al. 2002 (85) | Siero, liquido sinoviale |
| Artrite Reumatoide | Liao H. et al. 2004 (86) | Siero, liquido sinoviale |
| Artrite Reumatoide | Drynda S et al. 2004 (87) | Siero, liquido sinoviale |
| Artrite Reumatoide | de Seny D et al. 2005 (88) | Siero |
| Artrite Reumatoide | An Y et al. 2005 (89) | Siero |
| Artrite Reumatoide, Spondiloartrite, Osteoartrite | Tilleman K et al. 2005 (90) | Sinovia |
| Artrite cronica giovanile | Miyamae T et al. 2005 (91) | Siero |
| Sindrome di Sjogren | Tomosugi N. et al. 2005 (92) | Lacrime |
| Sindrome di Sjogren | Ryu O. et al. 2006 (81) | Saliva (flusso parotideo) |
| Granulomatosi di Wegener | Stone JH. et al. 2005 (93) | Siero |
| Sclerodermia | Fietta A. et al. 2006 (94) | Liquido broncoalveolare |

II. SCOPO DEL LAVORO

Lo scopo di questa tesi è stato quello di caratterizzare il pattern proteico della saliva di pazienti con SjS primitiva utilizzando la tecnologia proteomica. Per lo studio è stato scelto di analizzare il proteoma salivare, inteso come il completo set di proteine presenti nella cavità orale in un dato momento, combinando l'elettroforesi bidimensionale con la spettrometria di massa MALDI-TOF. La scelta della saliva è stata effettuata in relazione al caratteristico impegno clinico delle ghiandole salivari nella SjS, e considerando anche il crescente interesse per la saliva come strumento diagnostico in molte malattie sistemiche; essa, infatti, si configura come un fluido biologico più facilmente reperibile rispetto al siero e con una minore complessità in termini di numero di proteine e variabilità.

I risultati ottenuti sono stati confrontati, in primis, con soggetti sani che presentassero caratteristiche comparabili per sesso e per età.

Successivamente, la popolazione di controllo è stata allargata ad un gruppo di controllo "patologico" eterogeneo con finalità comparative diverse. Sono stati inclusi, allora, nello studio soggetti con xerostomia idiopatica, non affetti da SjS, allo scopo di valutare quali modificazioni del profilo proteico potessero rispecchiare più da vicino le modificazioni del cavo orale imputabili alla secchezza della mucosa orale di per sé. Sono poi stati studiati pazienti con profilo auto-anticorpale analogo ai soggetti con SjS e, nella fattispecie con anticorpi anti-Ro/SSA e anticorpi anti-Ro/SSA + anti-La/SSB, ma non affetti da xerostomia, allo scopo di valutare se esistessero eventuali correlazioni tra il profilo auto-anticorpale e le modificazioni nei livelli di proteine espresse. Infine, sono stati considerati pazienti affetti da un'altra malattia immunomediata capace di coinvolgere, anche se con meccanismi diversi, le ghiandole salivari: la Sclerodermia. La Sclerodermia è una connettivite sistemica, a patogenesi autoimmune, caratterizzata da una progressiva fibrosi che coinvolge la cute e gli organi interni (polmone, tratto gastroenterico, rene, cuore) (95). La malattia è provocata da una incontrollata proliferazione del tessuto connettivo e della matrice extracellulare ad opera dei fibroblasti cui si associano alterazioni vascolari localizzate soprattutto a livello del circolo arterioso più periferico (96, 97). Nella storia naturale della malattia è descritto un potenziale coinvolgimento delle ghiandole salivari di tipo fibrotico direttamente legato alla malattia. L'analisi di tipo istopatologico delle ghiandole salivari di pazienti con Sclerodermia ha, infatti, documentato un aumento del numero delle mast-cellule tissutali nonché un incremento nell'espressione delle isoforme del TGFβ2 e β3 a livello dei fibroblasti ghiandolari; elementi cellulari entrambi coinvolti nei

processi fibrotici (98). Poiché la Sclerodermia può, tuttavia, presentarsi in associazione alla SjS (95) ed è possibile, in questo caso, che i pazienti presentino un coinvolgimento delle ghiandole salivari legato alla sindrome di Sjogren secondaria, nello studio questo ultimo gruppo di pazienti è stato escluso. In conclusione, il gruppo di controllo patologico è risultato costituito da:

- a. soggetti con xerostomia idiopatica
- b. soggetti affetti da Sclerodermia
- c. soggetti asintomatici con anti-Ro/SSA
- d. soggetti asintomatici con anti-Ro/SSA e anti-La/SSB

Il confronto dei patterns proteici tra i diversi subset di soggetti arruolati nello studio ha avuto come obiettivo principale quello di evidenziare le alterazioni qualitative e quantitative peculiari solo dei pazienti con diagnosi di SjS primitiva, nel tentativo di isolare biomarkers specifici di malattia che avessero una potenziale valenza diagnostica per la SjS primitiva. Nell'ambito degli obiettivi secondari si è cercato di giustificare tali alterazioni alla luce delle più recenti acquisizioni eziopatogenetiche e cliniche disponibili per la malattia.

III. MATERIALI E METODI

IIIa. Pazienti

Nello studio sono stati arruolati 15 pazienti di sesso femminile ed età media $49,38 \pm 12,54$ ($M \pm DS$), affette da SjS primitiva e seguite presso l'U.O di Reumatologia dell'Università di Pisa. La diagnosi è stata formulata, nella totalità dei casi, in accordo con i più recenti Criteri Americani ed Europei per la malattia (7). La sintomatologia soggettiva dei pazienti, relativa alla secchezza oculare e all'impegno delle ghiandole salivari, è stata raccolta mediante apposito questionario validato. Per l'obiettivazione della secchezza oculare sono stati eseguiti nella totalità dei casi test di Schirmer e Rosa Bengala (o verde di lissamina) ed in tutti i casi sono stati determinati il profilo bio-umorale (comprensivo dell'elettroforesi proteica) e la ricerca degli autoanticorpi non organo specifici. In particolare, la ricerca degli anticorpi antinucleari, degli anti-Ro/SSA e anti-La/SSB e del fattore reumatoide è stata effettuata, rispettivamente, mediante immunofluorescenza su Hep2, contro-immunoelettroforesi e nefelometria. Infine, i soggetti sono stati sottoposti a biopsia delle ghiandole salivari minori la cui lettura è stata effettuata secondo il grading di Chisolm e Mason (99). Le caratteristiche cliniche e sierologiche delle pazienti sono riassunte nella tabella 4. In tutti i pazienti è stata esclusa un'infezione da virus HBV and HCV, virus scialotropi in grado di determinare una flogosi ghiandolare.

Il gruppo di controllo di soggetti sani è risultato costituito da 15 soggetti sani comparabili per sesso e per età con i pazienti arruolati ($45,83 \pm 17,38$; $M \pm DS$). Lo studio è poi stato allargato a 6 soggetti con sindrome secca idiopatica ($65,16 \pm 6,24$; $M \pm DS$), 6 pazienti con anticorpi anti-Ro/SSA ($38,4 \pm 9,45$; $M \pm DS$), 3 con anti-Ro/SSA ed anti-La SSB positivi senza sindrome secca ($42,33 \pm 7,63$; $M \pm DS$) e 15 pazienti con Sclerodermia diffusa e profilo autoanticorpale omogeneo positivo per anti-Scl 70 (età media $49,5 \pm 10$) ($M \pm DS$). La definizione di sindrome secca idiopatica è stata attribuita a soggetti con xerostomia apparentemente non attribuibile alle più comuni cause virologiche o farmacologiche, con profilo auto-anticorpale negativo e biopsia delle ghiandole salivari con grading di Chisolm Mason ≤ 2 . Nei soggetti asintomatici carrier di autoanticorpi la positività degli autoanticorpi anti Ro/SSA e anti La/SSB è stata confermata in almeno due successive determinazioni. La diagnosi di Sclerodermia, infine, è stata definita in accordo con i criteri classificativi internazionali (100). Sono stati esclusi dallo studio soggetti fumatori. Per l'inclusione nello studio tutti i partecipanti hanno rilasciato un consenso informato.

Tabella 4. *Caratteristiche clinico-sierologiche dei pazienti con SjS in studio*

| Caratteristica | Percentuale |
|---|--------------------|
| Xerostomia | 100% |
| Xeroftalmia | 100% |
| Test oculari (Schirmer o Rosa Bengala) | 100% |
| Uso quotidiano lacrime artificiali | 100% |
| Sensazione di sabbia negli occhi | 75% |
| Necessità di bere frequentemente nella giornata | 50% |
| Tumefazione ghiandole salivari maggiori | 15% |
| Biopsia ghiandole salivari positiva | 80% |
| FAN Hep2 > 1:160 | 85% |
| Anti-Ro/SSA | 75% |
| Anti-La/SSB | 25% |
| Ra test | 60% |
| Ipergammaglobulinemia | 80% |

IIIb. Materiali e Strumentazione

L'acqua, di grado analitico, è stata filtrata mediante l'apparecchio MilliQ (PS Whatman®, Millipore Corporation, Maid Stone, England).

Tutti i reagenti e i solventi sono stati acquistati dalle più comuni fonti commerciali.

Sono state utilizzate strip Immobiline™ DryStrip pH 3-10 L, di 18 cm, e le Ettan™ IPGphor™ Strip Holder, in ceramica, dell'Amersham Biosciences (Uppsala, Sweden).

L'apparecchio impiegato per l'isoelettrofocalizzazione è stato l'Ettan™ IPGphor™ Isoelectric Focusing System (Amersham Bioscience). Per fare i gel è stato utilizzato il Protean Plus Multicasting Chamber (Biorad).

L'apparecchio per l'elettroforesi usato è il Protean II XL Ready Gel (Biorad) con alimentatore EPS 601 Power Sully (Amersham Bioscience).

IIIc. Raccolta e preparazione del campione

I campioni di saliva dei soggetti sono raccolti tramite sputo, senza stimolazione chimica, al mattino e a digiuno. Per minimizzare la degradazione proteica, i campioni sono stati mantenuti in ghiaccio e trattati immediatamente. Da ogni soggetto sono stati ottenuti 1-2,5 ml di saliva che sono stati centrifugati a 14000 g per 20 minuti a 4°C per rimuovere materiale insolubile e cellule.

Nella preparazione il campione di saliva (già centrifugato per eliminare il materiale insolubile) viene addizionato ad acido tricloroacetico (TCA) al 20% e ditiotreitolo (DTT) allo 0,1% (1 ml di TCA per 1 ml di saliva: concentrazioni finali TCA 10% e DTT 0,05%) e le proteine vengono lasciate precipitare in ghiaccio per 30 minuti. Al termine del periodo di incubazione la sospensione è centrifugata a 14000 g per 10 minuti a 4°C. Il sovrantante viene eliminato, mentre il pellet ottenuto è risospeso con ultraturax in 2 ml di acetone a 4°C, quindi centrifugato a 14000 g per 15 minuti. Questa operazione di lavaggio con acetone freddo viene ripetuta altre due volte al fine di eliminare il TCA. Gli eventuali residui di acetone sono eliminati tramite evaporazione ed il pellet finale, che contiene le proteine presenti nella saliva, viene processato per effettuare la prima dimensione. Il pellet proteico è risospeso nella soluzione di reidratazione. La soluzione di reidratazione utilizzata è composta da:

Urea 7M – Thiourea 2M: servono per solubilizzare e denaturare le proteine così che siano presenti in una sola configurazione;

Chaps 4%: è un detergente non ionico che permette di solubilizzare le proteine idrofobiche e minimizzare l'aggregazione proteica;

Ditiotreitolo (DTT) 60mM: agente riducente, serve per rompere ogni ponte disolfuro e permettere alle proteine di distendersi completamente;

Blu di Bromofenolo 0,002%: per seguire la corsa, se il tracciante non migra all'anodo non c'è flusso di corrente;

Anfoliti (3-10) 0,5%: aumentano la solubilità delle proteine minimizzando la loro aggregazione dovuta ad interazioni carica-carica.

I campioni devono rimanere in tale soluzione 30 minuti, a temperatura ambiente, per ottenere una completa denaturazione e solubilizzazione. Una piccola aliquota del campione viene utilizzata per la determinazione della concentrazione proteica tramite il metodo RC/DC della Biorad (Peterson GL.), il volume restante viene utilizzato per la prima dimensione. Per i gel analitici le aliquote contengono 150 µg di proteine e vengono portate sino ad un volume finale di 350 µl con la soluzione di reidratazione. A questo punto i campioni possono essere utilizzati per la prima dimensione o congelati a -80°C ma in tal caso gli anfoliti sono omessi e vengono addizionati solo al momento della prima dimensione.

Dosaggio proteico RC/DC/BIORAD

Il DC protein assay è un dosaggio colorimetrico con cui viene costruita una curva di riferimento utilizzando una proteina standard che dovrà essere preparata nello stesso tampone del campione proteico di interesse. In questo caso la proteina standard albumina bovina, è risospesa nella soluzione di reidratazione. Vengono preparate quattro concentrazioni (con un volume di 25 µl) di proteina standard (0.2-0.4-0.8-1.5 mg/ml) che abbracciano l'intervallo di sensibilità del metodo (Tab.5).

Tabella 5. *Diluizioni della BSA per la retta di taratura.*

| | Rehydration | BSA | Concentrazione | µg BSA |
|--------|-------------|---------|----------------|--------|
| Bianco | 25µl | - | 0 µg/µl | 0 µg |
| 1 | 21,7µl | 3,3µl | 0,2 µg/µl | 4 µg |
| 2 | 18,3µl | 6,7µl | 0,4 µg/µl | 8 µg |
| 3 | 11,7 µl | 13,3 µl | 0,8 µg/µl | 16 µg |
| 4 | - | 25 µl | 1,5 µg/µl | 30 µg |

Per il dosaggio proteico del campione incognito si procede con una diluizione 1:10 o 1:5 dello stesso (si valuta sulla base del volume di soluzione scelto per la risospensione del campione) con la soluzione di reidratazione per avere un volume finale di 25 µl.

Il dosaggio viene effettuato in eppendorfs, in doppio; come bianco viene dosata la soluzione di reidratazione, a temperatura ambiente.

Agli standars ed ai campioni così preparati sono aggiunti 125 µl di reagente I, agitati su vortex, e incubati 1 minuto. Quindi vengono addizionati 125 µl di reagente II, agitati su vortex e centrifugati a 12000 g per 5 minuti. I sovrantanti sono scartati, e questo primo step è ripetuto variando i volumi di reagente I (125 µl) e II (40µl). Sono quindi addizionati 127 µl di reagente A* per ciascuna eppendorf, agitato e incubato per 5 min o finchè il precipitato non è completamente disciolto. Si addiziona infine 1 ml di reagente B in ciascuna eppendorf agitando immediatamente e si lascia in incubazione per 15 minuti. Al termine del periodo di incubazione si procede alla lettura dei campioni alla lunghezza d'onda di 750 nm.

Si costruisce una retta di taratura nell'intervallo di sensibilità da 5 µg a 37.5 µg: $y=Ax$, e dall'equazione della retta si procede al calcolo della concentrazione proteica per il campione incognito.

$$\frac{(\text{lettura campione} - \text{lettura bianco})}{\text{assorbanza}} \times \text{fattore diluizione} = \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$$

IIIId. Elettroforesi Bidimensionale

Isoelettrofocalizzazione

La prima dimensione è effettuata su strip di 18 cm in cui è presente un gradiente lineare di pH 3-10 (Amersham Biosciences).

-Il volume caricabile su una strip da 18 cm è di 350 µl.

-Il volume del campione deve essere < al 25% del volume totale.

-Al momento vengono aggiunti 0,5% di anfoliti.

Si caricano su strip holder i 350 µl del campione (pari a 150 µg di proteine); si pone sopra l'IPG strip e si copre con l'IPG Cover Fluid (Amersham Biosciences), un olio minerale che minimizza l'evaporazione e la cristallizzazione dell'urea, prima di chiudere con l'apposito coperchietto.

Per la prima dimensione è utilizzato l'Apparecchio IPGphor (Amersham Biosciences) che permette di impostare reidratazione e IEF del campione contemporaneamente (Tabella 6). Il programma utilizzato come tempi e voltaggio applicati è sotto elencato e arriva a permettere di ottenere fino ad ottenere 70000 V totali:

Tabella 6. *Ettan IPGphor Isoelectric Focusing System.*

| | | | |
|---------------|-----|-------|------|
| reidratazione | 1h | 0V | 16°C |
| I step | 10h | 30V | 16°C |
| II step | 1h | 200V | 16°C |
| III step | 30' | 300V | 16°C |
| IV step | 3h | 3500V | 16°C |
| V step | 10' | 5000V | 16°C |
| Vi step | 12h | 8000V | 16°C |

Gli alti voltaggi raggiunti richiedono un controllo della temperatura che infatti è mantenuta a 16°C per tutta la corsa. Inoltre, dopo la reidratazione delle strip, vengono inseriti sugli elettrodi dei quadratini di una apposita carta per isoelettrofocusing (electrode pads). Tali pads vengono inumiditi con acqua MilliQ e posti tra la strip e gli elettrodi per preservare questi ultimi dalla precipitazione degli ioni.

Al termine della IEF la strip viene ripulita dall'eccesso di olio minerale e utilizzata subito per la seconda dimensione o conservata a -20 °C.

Equilibratura

Prima di effettuare la seconda dimensione la strip viene equilibrata incubandola, in successione, con:

- 1) 10 ml di SDS Equilibration Buffer + DTT 1% per 15 minuti in agitazione a temperatura ambiente;
- 2) 10 ml di SDS Equilibration Buffer + IAA 2,5% per 15 minuti in agitazione a temperatura ambiente;

L' SDS equilibration buffer contiene:

Tampone equilibrante (Tris-HCl 50 mM pH 8,8): per mantenere le strip in un range di pH appropriato per l'elettroforesi;

Urea (6 M) *Glicerolo* (30%): per ridurre l'elettroosmosi e migliorare il trasferimento delle proteine alla seconda dimensione. L'elettroosmosi è dovuta alla presenza di cariche fisse sulla strip all'interno di un campo elettrico e può interferire con il trasferimento delle proteine dalla strip al gel della seconda dimensione;

Sodio dodecil solfato (2%): denatura le proteine e forma complessi proteina-SDS carichi negativamente. La quantità di SDS legato ad una proteina, e quindi la carica negativa, è direttamente proporzionale alla massa della proteina, in questo modo l'elettroforesi separerà le proteine in base al loro peso molecolare;

Blu di Bromofenolo (0,002%): usato come agente tracciante per seguire la corsa elettroforetica;

Ditiotreitolo (1%): agente riducente per preservare lo stato ridotto delle proteine;

Iodoacetammide (2,5%; al 2° lavaggio): per alchilare i gruppi tiolici delle proteine e prevenirne la riossidazione durante l'elettroforesi.

Seconda Dimensione

La strip viene posta sopra un gel di poliacrilammide 12% (20cm×20cm×1,5mm), facendo bene attenzione che aderisca in tutta la sua lunghezza al gel, e bloccata con una soluzione di agarosio 0.1% in Running Buffer.

L'elettroforesi è effettuata in due step: per i primi 15 minuti si impostano 15 mA per gel aumentando poi la corrente a 40 mA per gel finché il fronte del campione, visualizzato tramite il Blu di bromofenolo, esce dal fondo di corsa (circa 5:30 ore).

Per la corsa elettroforetica si utilizza il RUNNING BUFFER 10X (Tris-base 25mM, Glicina 192 mM, SDS 0.1%) diluito 1:10; la diluizione viene fatta il giorno precedente per mantenere il tampone a 4°C e poterlo utilizzare freddo.

Preparazione Del Gel 12% Nel Multicasting

Al fine di minimizzare la variabilità sperimentale e quindi aumentare la riproducibilità, i gel di acrilammide (12%) vengono preparati contemporaneamente (fino ad 8 gel-Tabella 7) utilizzando l'apparecchio Multicasting della Biorad e la corsa è condotta su di un apparecchio Protean II XI Multi-cell 2D in grado di ospitare e far correre contemporaneamente fino a 6 gel in condizioni termostate (circa 10°C).

Tabella 7. Volumi per 6 ed 8 gel di acrilammide al 12%.

| | 6 gel | 8 gel |
|---------------------------------|----------|----------|
| H ₂ O milliQ | 142.8 ml | 190.4 ml |
| Tampone Tris 1.5M pH8.8 | 105 ml | 140 ml |
| Acrilammide/bis-acrilammide 30% | 168 ml | 224 ml |
| Ammonio persolfato 10% | 2.1 ml | 2.8 ml |
| Temed | 105 µl | 140 µl |

Colorazione dei gel

I gel bidimensionali così ottenuti sono stati colorati utilizzando una colorazione all'argento/ammoniaca.

Alla fine della seconda dimensione, il gel viene rimosso dai vetri ed è lavato con acqua deionizzata per 5 min, quindi lasciato in etanolo:acido acetico:acqua (40:10:50) per un'ora, e successivamente in etanolo:acido acetico:acqua (5:5:90) per tutta la notte. All'indomani il gel viene sottoposto ad un processo multi-step:

- Viene lavato per 5 min con acqua deionizzata;
- Si lascia per 30 min in una soluzione di 1% glutaraldeide e 0,5M sodio acetato;
- Si lava 3x10 min con acqua deionizzata;
- Viene incubato 2x30 min con una soluzione di acido 2,7-naftalene disulfonico 0,05%;
- Al termine di questo periodo di incubazione il gel è nuovamente lavato 4x15 min con acqua deionizzata;
- Viene quindi colorato in una soluzione fresca di nitrato di argento 2,5% e ammoniaca 30% per 30 min;
- Dopo la colorazione, il gel è lavato con acqua deionizzata 4x4 min e sviluppato in soluzione di acido citrico 0,01% e formaldeide 0,1% per 3:40 min;
- La reazione è stoppata con una soluzione di Tris 5% e acido acetico al 2%.

Tutte gli steps della colorazione sono condotti a temperatura ambiente e sotto agitazione, inoltre i tempi di sviluppo sono mantenuti costanti per tutti i gel per poter fare confronti quantitativi oltre che qualitativi tra gel differenti.

Gel Preparativi

Per l'identificazione delle proteine d'interesse occorre estrarre queste ultime dal gel perché possano poi essere sequenziate tramite spettrometria di massa MALDI-TOF; la colorazione all'argento utilizzata non risulta però compatibile con la spettrometria di massa, pertanto occorre realizzare gel preparativi che saranno colorati con il Coomassie Colloidale; una colorazione meno sensibile di quella all'argento.

Questa procedura richiede quindi di caricare un quantitativo maggiore di proteine, nel nostro caso abbiamo caricato 1500 µg.

Prima dimensione

Per i gel preparativi si carica un volume di campione pari a 1500 µg e si arriva ad un volume finale di 400 µl con la soluzione di reidratazione. Si utilizzano sempre strip da 18 cm con un gradiente lineare di pH 3-10 e si aggiungono al momento 0,5% di anfoliti.

Cambia il programma utilizzato (Tabella 8):

Tabella 8. *Isoelettrofocusing per gel preparativi*

| | | | |
|---------------|------|-------|------|
| reidratazione | 1h | 0V | 16°C |
| I step | 12 h | 30V | 16°C |
| II step | 11h | 200V | 16°C |
| III step | 2 h | 300V | 16°C |
| IV step | 3h | 3500V | 16°C |
| V step | 3h | 3500V | 16°C |
| VI step | 15 h | 5000V | 16°C |

Seconda dimensione e colorazione

La procedura della seconda dimensione è analoga a quella utilizzata per i gel analitici ma per la colorazione si utilizza il Coomassie Brilliant Blue G-Colloidal che, a differenza della colorazione all'argento, è compatibile con la spettrometria di massa. Il *Coomassie Colloidale* contiene:

0,12% Coomassie Brilliant Blue G-250

10% Ammonio solfato

2% Acido fosforico.

Il colorante così preparato deve essere diluito al momento dell'utilizzo con il metanolo (4 parti di colorante per 1 di metanolo) agitando per 30 secondi. La colorazione prevede pochi passaggi:

- Terminata la corsa, il gel viene lasciato per un'ora, in agitazione, nella soluzione di fissaggio contenente il 7% di acido acetico ed il 40% di metanolo;
- Il gel è messo in incubazione nel colorante dalle 2 alle 12 ore;
- Si sostituisce il colorante con una soluzione di acido acetico (10%) e metanolo (25%) mantenendo il gel in agitazione, a temperatura ambiente, per 60 secondi;
- Si cambia la soluzione con un'altra di metanolo (25%), sempre agitando il gel, sostituendola dopo pochi secondi con una nuova di metanolo (25%) che può essere lasciata fino a 24 ore.

Analisi dei Gel Tramite Image Master 2D Platinum

Le immagini dei gel sono state acquisite tramite uno scanner (Epson Expression 1680) e analizzate con il programma Image Master 2D Platinum 5.0 dell'Amersham Bioscience. Tramite software si possono mettere a confronto i gel ottenuti dall'elettroforesi bidimensionale della saliva. Gli spots proteici di ciascun gel sono selezionati, numerati e confrontati (sovrapposti). I gel sono divisi nelle diverse classi in modo che il programma sia poi in grado di effettuare un confronto tra i gel all'interno della stessa classe e tra classi diverse. Il programma permette, infatti, di evidenziare eventuali variazioni nell'entità e/o nella presenza o assenza di determinate proteine. Dopo la messa in evidenza degli spot nei gel, sempre mediante software vengono generati dei gel sintetici uno per ciascuno dei gruppi di soggetti di volta in volta esaminati. Ciascuno dei gel sintetici contiene esclusivamente gli spot comuni a tutti i singoli gel del gruppo in esame ovvero solo gli spot espressi nella totalità dei gel del gruppo di soggetti in esame può entrare a far parte del gel sintetico. La finalità dei gel sintetici è stata quella di isolare un numero definito di proteine di interesse che sono state poi caratterizzate mediante spettrometria di massa. La valutazione quantitativa della densità ottica delle proteine nei diversi gruppi di soggetti in studio è, invece, stata valutata mediante il confronto delle medie dei singoli valori ottenute considerando gli spots proteici dei singoli gel di ciascun gruppo.

IIIe. MALDI-TOF

Preparazione dei campioni per MALDI-TOF

Gli spots proteici di interesse sono tagliati dal gel utilizzando per la digestione la tripsina seguendo la seguente procedura:

- i gel ottenuti mediante 2-DE vengono trattati con bicarbonato di ammonio 50mM e acetone (AcN) 30% per 30' a temperatura ambiente
- i gel vengono disidratati per 30' in una centrifuga Hetovac (HETO, Allerod, Denmark) e quindi reidratati per 45' a 4°C in 5-20 µl di una soluzione 50 mM di bicarbonato di ammonio contenente tripsina a 6.25 ng/ µl
- Dopo il periodo di incubazione di una notte, i gel vengono disidratati in centrifuga, reidratati con 20 µl di H₂O e alla fine disidratati di nuovo
- L'eluizione dei peptidi viene effettuata con 20 µl di acido trifluoroacetico (TFA) all'0.1% per 20' a temperatura ambiente
- La soluzione di TFA contenente le proteine di è trasferita in un tubo di propilene
- Una seconda eluizione dei peptidi viene effettuata con 20 µl di TFA allo 0'1% in 50% AcN per 20' a temperatura ambiente
- Le due eluizioni vengono poste insieme e il volume complessivo viene ridotto di 1-2 µl per evaporazione
- Estrazioni di controllo vengono effettuate utilizzando parti dei gel privi di proteine
- Gli spots sono così inviati al Core Facility Proteomic (Università di Ginevra) per l'analisi spettrometrica che consente di identificare le proteine.

Identificazione proteica mediante finger printing (MALDI-TOF)

Prima del finger printing, le soluzioni contenenti i peptidi vengono addizionate con TFA allo 0.1% in 50% AcN e portate ad un volume di 5 µl. Un microlitro di ciascun campione viene depositato su una piastra 2 x 96 della MALDI e portato a secco sottovuoto. Viene aggiunto un ugual volume di matrice (10 mg/ml α -cyano-4-hydroxycinnamic acid in 50% AcN, 0.1% TFA). I campioni vengono portati a secco sottovuoto nuovamente. La MS è stata condotta mediante lo spettrometro Voyager super STR (Applied Biosystems, Foster City, CA) corredato di un laser nitrogene di 337 nm. L'analisi è stata eseguita in reflectrone con un acceleratore di voltaggio di 20 kV, un parametro di ritardo di estrazione di 350 ns, e un limite basso di massa di 850 Da. Gli spettri sono stati ottenuti dalla somma di 150-300 spari laser consecutivi. I picchi di massa sono stati estratti dagli spettri e l'identificazione proteica è stata effettuata utilizzando il MASCOT 2.1 peptide mass

fingerprint tool e il motore di ricerca ProFound del PROWL (<http://prwl.rockefeller.edu>). Come databases sono stati utilizzati il SWISS_PROT e il TrEMBL utilizzando come limiti per la ricerca i seguenti: specie umana, tolleranza della massa ± 50 ppm, clivaggio perso con la tripsina fino a 1 e modificazioni della cisterna per carbamidometilazione.

III f. Analisi Statistica

I valori di densità ottica delle proteine di interesse sono stati espressi come % di volume. L'analisi statistica di comparazione tra i livelli di espressione delle singole proteine nella saliva dei pazienti arruolati è stata effettuata mediante test ANOVA per il confronto delle medie tra più gruppi analizzati simultaneamente e mediante *t*-test per il confronto delle medie dei gruppi a due a due. Un p-value <0.05 è stato considerato statisticamente significativo.

IV. RISULTATI

IVa. ANALISI DEI GEL SINTETICI

Le figure allegate rappresentano rispettivamente le immagini dei gel sintetici e dei gel rappresentativi ottenuti dalla saliva dei soggetti sani e dei pazienti con SjS, Sclerodermia, sindrome secca, e profilo autoanticorpale patologico: anti-SSA e anti-SSA + anti-SSB positivi. (Fig 6-17 vedi allegati)

Il confronto della percentuale di volume degli spot presenti nei gel sintetici dei gruppi in esame, considerati a due a due, ha evidenziato differenze statisticamente significative nell'espressione qualitativa e quantitativa di numerose proteine salivari.

In particolare, comparando il gel sintetico ottenuto dal gruppo di pazienti affetti da SjS con quello dei controlli, è stato possibile identificare 10 spots presenti solo nel gel sintetico patologico e 4 spots presenti solo in quello dei controlli. Nell'ambito dei 10 spots è stata evidenziata la presenza di diverse proteine con pI tra 5,0 e 6,5 e PM intorno a 30-45 Kda, come il precursore della Zn- α_2 -glicoproteina (spot n° 33)*, anche se l'analisi di massa non è stata in grado di identificare la totalità degli spots (spots n°48, 46, 30, 34). E' inoltre stato possibile documentare la presenza di numerose proteine coinvolte nei processi flogistici come: la calgranulina B, la lipocalina e la fosfatidiletanolamina binding protein, nonché, spots (n°47) relativi all'espressione della catena leggera κ delle immunoglobuline. Nell'ambito degli spots presenti solo nel gel sintetico dei controlli è invece da sottolineare quello (spot n° 29) relativo alla carbonato anidrasi VI e alle cistatine e ai loro precursori (cistatina D, C, S) (spots n° 5,7,12). La tabella 9 riassume le principali differenze qualitative che lo studio ha permesso di evidenziare. La tabella 10 mostra, invece, le differenze quantitative relative alle proteine la cui espressione differisce di almeno due volte nei due gruppi. L'analisi dei gel, infatti, ha mostrato 14 spots caratterizzati da una diversa intensità tra pazienti e controlli: 10 spots mostravano un costante incremento (spots n°10, 35, 36, 32, 17, 2, 4, 18, 19, 21) nei malati rispetto ai controlli mentre 4 risultavano significativamente meno intensi (spots n°40, 9, 23, 16) nei pazienti con SjS (102,103).

**I numeri degli spots si riferiscono ai gel rappresentativi*

Tabella 9. Proteine presenti esclusivamente nel gel sintetico dei pazienti con Sjs o nei soggetti sani

| Spot No | Protein | Swiss-Prot accession no | Mr (x10 ³) | pI | sequence coverage% | Matched peptides |
|-----------------------|--|-------------------------|------------------------|------|--------------------|------------------|
| Controlli sani | | | | | | |
| 5 | Cystatin D | P28325 | 16.1 | 7.63 | 31 | 5 |
| 7 | Cystatin C precursor | P01034 | 16 | 9.00 | 49 | 14 |
| 12 | Cystatin S precursor | P01036 | 16.4 | 4.95 | 68 | 12 |
| 29 | Carbonic anhydrase VI | Q5FC00 | 35.4 | 8.43 | 24 | 9 |
| Sjs | | | | | | |
| 41 | Calgranulin B | P06702 | 13.2 | 5.71 | 76 | 9 |
| 42 | Cyclophilin A | P62937 | 18 | 7.82 | 85 | 17 |
| 43 | Lipocalin-1 precursor | P31025 | 19.4 | 5.39 | 31 | 4 |
| 45 | Phosphatidyl ethanolamine binding protein (PEBP) | P30086 | 21 | 7.42 | 92 | 20 |
| 47 | IGKC protein | Q6GMW1 | 26 | 7.55 | 41 | 8 |
| 33 | Zinc- α_2 -glycoprotein precursor | P25311 | 34 | 5.57 | 23 | 11 |

Tabella 10. Proteine espresso con diversa concentrazione nei gel sintetici dei SjS e dei controlli sani

| Spot No | Protein name | Swiss-Prot accession no. | Mr(x10 ³) | | pI | | sequence coverage % | Matched peptides | Score |
|---------|--|--------------------------|-----------------------|--------|-------|--------|---------------------|------------------|-------|
| | | | Theor | Observ | Theor | Observ | | | |
| 10 | fatty acid-binding protein(E-FABP) | Q01469 | 15.3 | 12.0 | 6.84 | 6.48 | 68 | 17 | 108 |
| 35 | ACTB protein (actin) | Q96E67 | 40.5 | 40.1 | 5.55 | 5.24 | 57 | 21 | 114 |
| 36 | β-actin fragment | Q96HG5 | 41.3 | 41.0 | 5.56 | 5.04 | 23 | 8 | 50 |
| 32 | leukocyte elastase inhibitor | P30740 | 42.8 | 40.7 | 5.90 | 6.08 | 23 | 8 | 43 |
| 17 | glutathione-S-transferase | P09211 | 23.4 | 23.4 | 5.44 | 5.56 | 32 | 6 | 48 |
| 40 | α-amylase precursor | P04745 | 58.4 | 54.9 | 6.47 | 6.40 | 62 | 31 | 177 |
| 9 | cystatin SN precursor | P01037 | 16.5 | 12.0 | 6.82 | 7.52 | 69 | 10 | 105 |
| 23 | keratin 6-L | Q5XKE5 | 58 | 33.1 | 6.75 | 4.52 | 14 | 7 | 37 |
| 16 | prolactin-inducible protein precursor(PIP) | P12273 | 16.8 | 14.8 | 8.26 | 4.64 | 69 | 10 | 105 |
| 18 | not identified | -- | nd | 23.4 | nd | 5.20 | -- | -- | -- |
| 19 | not identified | -- | nd | 23.9 | nd | 5.00 | -- | -- | -- |
| 21 | not identified | -- | nd | 24.5 | nd | 7.32 | -- | -- | -- |
| 4 | not identified | -- | nd | 11.8 | nd | 5.60 | -- | -- | -- |
| 2 | not identified | -- | nd | 42.8 | nd | 6.36 | -- | -- | -- |

Il confronto tra il gel sintetico dei pazienti con Sclerodermia e dei controlli sani ha, invece, messo in luce 20 spots che sono risultati presenti solo nelle immagini bidimensionali dei soggetti con Sclerodermia ed assenti nei controlli. Con la spettrometria di massa è stato possibile identificare 13 di tali 20 spots che sono risultati confluire in 9 proteine identificate come: ciclofillina A (spot n°42), calgranulina B (spots n°41, 52, 53, 54), psoriasina (spot n°55), beta-2-microglobulina (spot n°56), calgranulina A (spot n°57, 58), gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (spot n°64), TPI (spot n°65), complesso Arp2/3 (spot n°67) e cistatina B (spot n°59). La tabella 11 riassume questi risultati.

Nel confronto tra gel sintetico dei pazienti con Sclerodermia e SjS gli spots relativi a psoriasina (spot n°55), calgranulina A (spot n°57, 58), gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (spot n°64), TPI (spot n°65), complesso Arp2/3 (spot n°67) e cistatina B (spot n°59) e carbonato anidrasi VI (spot n°26-29) risultavano presenti solo nel gel sintetico dei pazienti con sclerodermia. Non risultavano, invece, identificabili nel gel sintetico dei pazienti con Sclerodermia gli spot relativi alla E-FABP e alla lipocalina . Ulteriori differenze tra gel sintetici dei pazienti con SjS e Sclerodermia emergevano nell'espressione delle cistatine e dei loro precursori, dell' α -amilasi salivare, della cheratina 6L, della PIP, della glutatione-S-transferasi e dell'inibitore dell'elastasi leucocitaria.

Tabella 11. Spot proteici identificati solo nel gel sintetico dei pazienti con Scleroderma e non nei controlli

| Spot No | Protein | Swiss-Prot accession no | Mr (x10 ³) | pI | sequence coverage% | Matched peptides |
|---------|---|-------------------------|------------------------|------|--------------------|------------------|
| 41 | Calgranulin B | P06702 | 13.2 | 5.71 | 76 | 9 |
| 52 | Calgranulin B | P06702 | 13.2 | 5.71 | 53 | 5 |
| 54 | Calgranulin B | P06702 | 13.2 | 5.71 | 70 | 7 |
| 53 | Calgranulin B** | P06702 | 13.2 | 5.71 | 55 | 7 |
| 55 | Psoriasis | P31151 | 11.4 | 6.26 | 49 | 7 |
| 56 | β2-microglobulin | Q6IAT8 | 13.8 | 6.06 | 37 | 4 |
| 57 | Calgranulin A | P05109 | 10.8 | 6.51 | 62 | 8 |
| 58 | Calgranulin A | P05109 | 10.8 | 6.51 | 63 | 11 |
| 59 | Cystatin B | P04080 | 11.1 | 6.96 | 64 | 6 |
| 42 | Cyclophilin A | P62937 | 18 | 7.82 | 54 | 11 |
| 64 | Glyceraldeyde-3-**-phosphate dehydrogenase | P04406 | 35.9 | 8.58 | 23 | 5 |
| 65 | Triose phosphate isomerase | P60174 | 26.8 | 6.51 | 62 | 15 |
| 67 | Actin-related protein 2/3 complex subunit 2 | O15144 | 34.4 | 6.84 | 43 | 18 |

I risultati del confronto dei rimanenti gel sintetici sono riassunti nella Tabella 12

Tabella 12: Gel sintetici a confronto

| | | | | | | |
|------------|----------------------------------|---------|------|-----------------------|-----|-------------------|
| vs | Sindrome secca idiopatica | | | | | |
| SjS | lipocalina | amilasi | PEPB | Carbonato anidrasi VI | PIP | Cistatina B, D, S |

| | | | | | | |
|------------|--------------------|---------|-----------------------|-----|-------------------|--|
| vs | Anti-Ro/SSA | | | | | |
| SjS | lipocalina | amilasi | Carbonato anidrasi VI | PIP | Cistatina B, D, S | |

| | | | | | | |
|------------|----------------------------------|---------------------------------|--|--|-----|-------------|
| vs | Sindrome secca idiopatica | | | | | |
| SjS | lipocalina | Inibitore elastasi leucocitaria | | | PIP | Cistatina D |

| | | | | | | |
|---------------------|----------------------------------|-------------|----------------|--------------|-----|----------------|
| vs | Sindrome secca idiopatica | | | | | |
| Sclerodermia | Cistatina B | Cistatina S | Calgranulina B | Cistatina SN | PIP | Ciclofillina A |

| | | | | | | |
|---------------------|--------------------|-------------|----------------|--------------|--------|---------------------------|
| vs | Anti-Ro/SSA | | | | | |
| Sclerodermia | Cistatina B | Cistatina D | Calgranulina B | Cistatina SN | actina | β -2 microglobulina |

| | | | | | | |
|---------------------|----------------------------------|--|---------|--------------|--|--|
| vs | Anti-Ro/SSA + Anti-La/SSB | | | | | |
| Sclerodermia | Cistatina B | | amilasi | Cistatina SN | | |

| | | | | | | |
|--------------------|----------------------------------|--|----------------------|--|----------------------|--|
| vs | Anti-Ro/SSA + Anti-La/SSB | | | | | |
| Anti-Ro/SSA | β -2 microglobulina | | Spot n° 68 (non id.) | | Spot n° 80 (non id.) | |

| | | | | | | |
|--------------------|----------------------------------|--|-------------|----------------|-----|--|
| vs | Sindrome secca idiopatica | | | | | |
| Anti-Ro/SSA | Calgranulina B | | Cistatina S | Calgranulina A | PIP | |

| | | | | | | |
|----------------------------------|----------------------------------|----------------------|----------------|---------------------|--|--|
| vs | Sindrome secca idiopatica | | | | | |
| Anti-Ro/SSA + Anti-La/SSB | amilasi | Spot n° 91 (non id.) | Calgranulina B | Spot n° 5 (non id.) | | |

L'analisi dei gel sintetici data l'alta stringenza dei gel stessi (100%) non permette di valutare in maniera effettiva variazioni qualitative o quantitative nell'espressione delle proteine dal momento

che sono automaticamente esclusi dal sintetico gli spot non condivisi da tutti i singoli gel di ciascun gruppo. Tuttavia essa ha consentito di restringere il campo d'analisi a 15 proteine la cui espressione sembra variare in maniera significativa nei gruppi.

IVb. ANALISI QUANTITATIVA DELLE PROTEINE DI INTERESSE

I dati preliminari hanno consentito di identificare 15 proteine espresse in maniera diversa nei gruppi in esame. Tali proteine sono elencate in Tabella 13 insieme all'analisi quantitativa della percentuale di volume ad esse relativa che è stata condotta misurando le singole percentuali di volume di ciascuno spot di interesse su ciascuno dei gel analitici di ogni gruppo e calcolandone media e deviazione standard.

Tabella 13. Media e deviazione standard della densità ottica delle proteine

| | Controllo sano | | SjS | | Sindrome secca | | Sclerodermia | | SSA | | SSA/SSB | |
|--------------------------|----------------|----------|----------|----------|----------------|----------|--------------|----------|---------|----------|---------|----------|
| | media | DS | media | DS | media | DS | media | DS | media | DS | media | DS |
| amilasi | 2.758571 | 1.049070 | 0.793333 | 0.434885 | 1.412000 | 0.598000 | 3.618000 | 3.120203 | 3.1067 | 2.301127 | 0.9500 | 0.532000 |
| PIP | 9.027143 | 3.641473 | 3.050000 | 2.033273 | 2.060000 | 2.738786 | 5.354000 | 1.742708 | 4.8433 | 1.836264 | 3.5680 | 3.801200 |
| albumina | 2.654286 | 0.627876 | 2.293000 | 2.016339 | 1.727500 | 0.991543 | 3.294000 | 1.229789 | 2.9140 | 1.200637 | 1.4260 | 0.800768 |
| cheratina 6L | 1.844000 | 0.510911 | 0.290000 | 0.485489 | 0.101000 | 0.174937 | 4.910000 | 1.307918 | 2.0325 | 1.607407 | 1.4125 | 1.984698 |
| actina | 0.661000 | 0.250000 | 1.340000 | 0.340000 | 1.236667 | 0.615911 | 0.690909 | 0.309207 | 0.99200 | 0.392173 | 0.9500 | 0.532466 |
| carbonato VI | 3.395714 | 1.375753 | 0.414000 | 0.625392 | 0.690000 | 0.283196 | 0.816000 | 0.578299 | 2.6025 | 2.244777 | 0.2260 | 0.311897 |
| cistatina SN | 4.764615 | 1.882947 | 1.419615 | 0.735749 | 0.967500 | 0.781340 | 6.127833 | 4.283895 | 2.3467 | 0.615169 | 3.4975 | 3.242452 |
| cistatina S | 2.086000 | 0.480240 | 0.735714 | 0.548266 | 0.462250 | 0.221447 | 1.501667 | 0.471950 | 1.2000 | 0.420535 | 0.3375 | 0.430842 |
| cistatina D | 0.734000 | 0.698000 | 0.527273 | 0.621741 | 0.517500 | 0.531311 | 1.640000 | 0.669925 | 0.7520 | 0.353935 | 1.1575 | 0.526712 |
| Imib. Elastasi leuc | 0.170000 | 0.020000 | 0.540000 | 0.110000 | 0.280000 | 0.226936 | 0.218333 | 0.094110 | 0.2470 | 0.40106 | 0.2840 | 0.240217 |
| lipocalina | 0.020000 | 0.056569 | 0.165000 | 0.110454 | 0.031667 | 0.077567 | nd | | nd | | nd | |
| ciclofillina A | nd | | 0.358000 | 0.110454 | 0.260000 | 0.109087 | 0.262857 | 0.089762 | 0.2467 | 0.064291 | 0.1800 | 0.17356 |
| calgranulina B | 0.091667 | 0.142887 | 2.442000 | 1.353706 | 1.890000 | 0.470957 | 3.302857 | 1.353067 | 1.7317 | 0.853379 | 2.6525 | 1.654476 |
| β 2 microglobulina | 0.580000 | 0.370135 | 1.793000 | 0.624000 | 0.887000 | 0.299070 | 1.112500 | 0.615090 | 0.5133 | 0.166693 | 1.08800 | 0.574000 |
| IgKc | 0.272000 | 0.177398 | 0.760000 | 0.214243 | 0.570000 | 0.203000 | 0.243333 | 0.230275 | 0.3645 | 0.194491 | 0.4400 | 0.229637 |

Il confronto delle medie della densità ottica nei gruppi è stato effettuato mediante test ANOVA e i risultati ottenuti sono riassunti in tabella 14.

Tabella 14. Test ANOVA per il confronto delle medie della densità ottica tra i gruppi

| | ANOVA su tutti i gruppi | Espressione nello SjS |
|---------------------------------|----------------------------|-----------------------|
| albumina | p=0,28 | invariata |
| amilasi | p=0,013 | ridotta |
| PIP | p=0.001 | ridotta |
| cheratina 6L | p=0,004 | ridotta |
| carbonato VI | p<0.0001 | ridotta |
| actina | p=0.001 | aumentata |
| cistatina SN | p<0.0001 | ridotta |
| cistatina S | p<0,0001 | ridotta |
| cistatina D | p=0,018 | ridotta |
| Inibitore elastasi leucocitaria | p<0,0001 | aumentato |
| lipocalina | p=0,003 | aumentata |
| ciclofillina A | p=? | aumentata |
| calgranulina B | p=0,001 | aumentata |
| β-2 microglobulina | p=0,0007 | aumentata |
| IgKc | p=0.0013 | aumentata |

Per chiarire il significato delle differenze osservate con il test ANOVA il confronto delle medie della densità ottica dei diversi spot rispetto alla SjS è stato effettuato mediante t-test di Student ed i risultati ottenuti sono riassunti in tabella 15.

Tabella 15. Risultati t-test confronto SjS verso controlli sani e patologici

| p- value (SjS vs..) | sano | sicca | sclero | SSA | SSA/SSB |
|------------------------|-------------------|--------------|-------------------|---------------|-------------|
| albumina | 0,65 | 0,60 | 0,33 | 0,54 | 0,37 |
| amilasi | 0,0002 | 0,06 | 0,01 | 0,01 | 0,82 |
| PIP | 0,0009 | 0,45 | 0,05 | 0,10 | 0,74 |
| cheratina 6L | 0,0011 | 0,40 | <0,0001 | 0,06 | 0,25 |
| carbonato VI | <0,0001 | 0,42 | 0,25 | 0,01 | 0,54 |
| actina | <0,0001 | 0,69 | 0,0027 | 0,01 | 0,01 |
| cistatina SN | <0,0001 | 0,30 | 0,001 | 0,06 | 0,03 |
| cistatina S | 0,0013 | 0,37 | 0,02 | 0,14 | 0,24 |
| cistatina D | 0,51 | 0,97 | 0,003 | 0,46 | 0,09 |
| Inib. Elastasi leuc | 0,0001 | 0,007 | 0,0001 | 0,03 | 0,01 |
| lipocalina | 0,0056 | 0,02 | nd | nd | nd |
| ciclofillina A | nd | 0,20 | 0,137 | 0,18 | 0,07 |
| calgranulina B | 0,002 | 0,46 | 0,30 | 0,31 | 0,83 |
| β-2 microglobulina | 0,0025 | 0,023 | 0,045 | 0,0004 | 0,06 |
| IgKc | 0,0019 | 0,15 | 0,0015 | 0,005 | 0,04 |

La tabella 16 illustra, infine, i risultati del confronto tra i vari gruppi e i controlli sani.

Tabella 16. Risultati di confronto dei gruppi patologici verso il gruppo di controllo dei soggetti sani ricavati con il t-test di Student

| p- value (sano vs..) | SjS | sicca | sclero | SSA | SSA/SSB |
|---------------------------|-------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| albumina | 0,65 | 0,08 | 0,26 | 0,63 | 0,06 |
| amilasi | 0,0002 | 0,03 | 0,50 | 0,72 | 0,05 |
| PIP | 0,0009 | 0,0049 | 0,06 | 0,03 | 0,01 |
| cheratina 6L | 0,0011 | 0,0014 | 0,001 | 0,33 | 0,42 |
| carbonato VI | <0,0001 | 0,0042 | 0,003 | 0,47 | 0,0005 |
| actina | <0,0001 | 0,023 | 0,8 | 0,06 | 0,18 |
| cistatina SN | <0,0001 | 0,0015 | 0,34 | 0,06 | 0,33 |
| cistatina S | 0,0013 | 0,0004 | 0,07 | 0,01 | 0,0008 |
| cistatina D | 0,51 | 0,59 | 0,03 | 0,95 | 0,31 |
| Inib. Elastasi leuc | 0,0001 | 0,11 | 0,11 | 0,11 | 0,12 |
| lipocalina | 0,0056 | 0,7 | nd | nd | nd |
| calgranulina B | 0,002 | 0,0001 | 0,0001 | 0,0009 | 0,005 |
| β -2 microglobulina | 0,002 | 0,22 | 0,11 | 0,69 | 0,13 |
| IgKc | 0,0019 | 0,03 | 0,82 | 0,43 | 0,25 |

V. DISCUSSIONE

I risultati ottenuti hanno permesso di mettere in evidenza numerose differenze tra il pattern proteico salivare dei pazienti con SjS ed i profili proteici salivari dei soggetti sani e dei controlli patologici.

In particolare nello studio sono state valutate le differenze relative all'espressione delle seguenti proteine salivari:

- proteine salivari acinari (albumina, α -amilasi salivare, PIP, cheratina 6L, anidrase carbonica VI).
- proteine infiammatorie e legate all'autoimmunità (calgranulina B, ciclofillina A, catena leggera κ delle immunoglobuline, beta2-microglobulina)
- proteine coinvolte nell'equilibrio proteasi / antiproteasi (cistatine D, S, SN e loro precursori, inibitore dell'elastasi leucocitaria)
- proteine coinvolte nel danno tissutale (actina, lipocalina-1 precursore)

Il profilo di espressione delle proteine salivari prodotte a livello acinare appare modificato nei pazienti con SjS rispetto ai controlli sani con una riduzione dell'intensità ottica dello spot principale dell'albumina e degli spot dell' α -amilasi salivare, della PIP, della cheratina 6L e della carbonato anidrase VI. E' possibile osservare una riduzione dell'espressione delle suddette proteine acinari (seppure ai limiti della significatività statistica) anche nei profili proteici salivari dei controlli patologici, secondo un gradiente che avvicina i pazienti con SjS a quelli con sindrome sicca idiopatica e ai soggetti asintomatici con anticorpi anti-RoSSA/+ anti-La/SSB e, viceversa, i controlli sani ai soggetti affetti da sclerodermia e ai portatori asintomatici di anti-Ro/SSA. I dati ottenuti sono in linea con gli studi della letteratura che documentano nella saliva dei pazienti con SjS una riduzione dell' α -amilasi salivare e della carbonato deidrogenasi VI (81). Le ipotesi proposte per giustificare la ridotta espressione delle proteine suddette sono fondamentalmente quelle della frammentazione proteica aumentata e quella di una ridotta produzione da danno acinare. La prima ipotesi può giustificare in maniera relativamente lineare la riduzione dello spot principale dell'albumina nei pazienti con SjS: quando esso viene sommato ai frammenti di albumina identificati alla spettrometria di massa, la densità degli spot totali dell'albumina non risulta statisticamente differente nel confronto tra i pazienti con SjS e tutti gli altri gruppi in studio. Anche la riduzione della PIP potrebbe essere correlata sia ad una ridotta

produzione che allo stato di infiammazione subclinica cronica del cavo orale dal momento che nel confronto con i controlli sani essa si riduce in particolare nei soggetti con SjS e con sindrome secca. La PIP è, infatti, una proteina di secrezione presente nella saliva in forma glicosilata e non glicosilata la cui funzione seppure in larga parte ancora da chiarire, sembra essere quella di legarsi ad altre proteine come il fibrinogeno, l'actina, la cheratina, la miosina e la tropomiosina. La PIP si lega anche all'idrossiapatite, componente principale della pellicola dei denti e sembra capace di legarsi ai batteri del cavo orale svolgendo un ruolo potenziale nell'immunità innata e nella difesa delle mucose (104). La riduzione della PIP che è stata evidenziata potrebbe, pertanto, essere analoga a quella della PIP lacrimale descritta nei pazienti con blefarite cronica. Altre due proteine ricche in prolina, che si riducono nei controlli patologici sono l' α -amilasi salivare e la carbonato deidrogenasi VI, la prima è un'idrolasi coinvolta nella digestione buccale dell'amido, la seconda nell'idratazione reversibile del diossido di carbonio e, di conseguenza, nel mantenimento dell'omeostasi del pH salivare. La riduzione della carbonato deidrogenasi è probabilmente la più eclatante al punto che gli spots (es.n° 26-29) che l'identificano sono addirittura mancanti nel gel sintetico dei soggetti con SjS. Il risultato può giustificare anche la tendenza del pH salivare dei pazienti con SjS ad essere complessivamente più basso (pH 6.75 ± 0.41) che nei controlli sani (pH 7.00 ± 0.48). Nel dettaglio nei gel dei soggetti sani è stato possibile identificare tre diversi spots per la carbonato deidrogenasi VI, probabilmente correlabili a isoforme dell'enzima, mentre nei singoli gel dei pazienti con SjS è stato possibile documentarne o una marcata riduzione o addirittura la non espressione. Questo dato è in linea con quanto recentemente pubblicato in letteratura in cui è stata documentata una riduzione dell'espressione del gene della carbonato deidratasi VI nelle ghiandole salivari minori dei pazienti con SjS (105). Una riduzione della carbonato deidrogenasi VI è in realtà evidenziabile anche nei soggetti con sindrome secca, con sclerodermia e nei portatori asintomatici di anti-Ro/SSA+ anti-La/SSB, mentre i valori di densità dei portatori degli anti-Ro/SSA sono sovrapponibili ai controlli sani. Infine, sempre nell'ambito dell'espressione delle proteine acinari, lo studio ha permesso di documentare una riduzione nell'espressione della cheratina 6L nei soggetti con SjS e sindrome secca ed uno spiccato aumento della stessa nei pazienti con Sclerodermia ($p < 0,0001$), verosimilmente in relazione al processo fibrotico che caratterizza la malattia. Complessivamente, con l'eccezione della cheratina, relativamente all'espressione delle proteine acinari si conferma quindi lo spettro di riduzione che ha ai due estremi i gel dei pazienti con SjS e i controlli sani. I soggetti con sindrome secca idiopatica e quelli con

anticorpi anti-Ro/SSA+ anti-La/SSB sono più simili ai pazienti con SjS, i pazienti con sclerodermia e quelli con anti-Ro/SSA ai controlli sani.

Accanto alle modificazioni nei livelli di espressione delle proteine salivari tipiche, il pattern proteico salivare dei pazienti con SjS presenta una combinazione di proteine pro-infiammatorie e legate al sistema immunitario. In realtà, proteine infiammatorie come la calgranulina B e la ciclofillina A, sono espresse in maniera aumentata, e non significativamente diversa che nello SjS, anche nei profili salivari dei pazienti con sindrome secca, sclerodermia e autoanticorpi anti-Ro/SSA e anti-Ro/SSA + anti La/SSB. assumendo quindi un significato aspecifico. La ciclofillina A è il prototipo di una famiglia di proteine altamente conservate, coinvolte in molti processi biologici come l'espressione, l'assemblamento e la degradazione delle proteine. Nell'ambito dei processi di flogosi la ciclofillina A sembra agire con meccanismo autocrino e paracrino, come attivatore delle cellule endoteliali contribuendo all'attivazione immuno-mediata e alla disfunzione endoteliale. La calgranulina B, invece, appartiene alla famiglia S100 delle proteine leganti il calcio ed è noto che viene espressa sia nei processi di flogosi acuta che nei processi di flogosi cronica. A differenza della calgranulina B e della ciclofillina A, i pazienti con SjS presentano un aumento statisticamente significativo, rispetto agli altri gruppi di pazienti, della beta-2 microglobulina e dell'espressione della catena leggera κ delle immunoglobuline. Questo risultato, può riflettere l'attivazione policlonale, sistemica e salivare, dei linfociti B nella sindrome di SjS e conferma, anche in questo caso, precedenti osservazioni della letteratura (40, 81).

Un ulteriore elemento peculiare del pattern salivare dei pazienti con SjS presente solo nei soggetti con sindrome secca idiopatica e non nei controlli sani nè nei pazienti con sclerodermia anti-Ro/SSA e anti-Ro/SSA + anti-La/SSB, concerne l'alterazione del bilancio tra proteasi e anti-proteasi salivari. Il dato più rilevante è a carico delle cistatine, S e SN. Le cistatine sono proteine inibitrici delle cistein-proteinasi che svolgono il ruolo di proteggere i tessuti da un'attivazione di sregolata delle proteinasi stesse. Le cistatine sono espresse in una ampia varietà di isoforme che possono differenziarsi per il grado di fosforilazione e/o glicosilazione. Nello studio la loro marcata riduzione può riflettere un consumo da parte delle proteasi considerando la variazione consensuale nella SjS e nelle sindromi sicche idiopatiche della cistatina SN e della S. La cistatina D non sembra presentare modificazioni significative nei pazienti con SJS rispetto ai controlli sani e agli altri gruppi patologici, con l'eccezione della Sclerodermia nella quale i livelli di cistatina D sembrano essere aumentati. Nell'ambito delle alterazioni presentate dal sistema degli

inibitori delle proteasi si osserva, inoltre, in modo peculiare nei pazienti con SjS, un aumento nei livelli di espressione di altre proteine inibitrici di proteasi salivari come la proteina inibitrice dell'elastasi leucocitaria. Questa proteina appartiene alla famiglia delle proteine inibitrici delle serin-proteasi e regola in primis l'attività delle proteasi dei neutrofili /elastasi, catepsina G e proteinasi 3. Il significato ultimo dello squilibrio osservato e la preponderante espressione delle proteine inibitrici le serin-proteasi sulle cistein-proteasi rimane in larga parte da chiarire.

Infine, in generale, nella saliva dei pazienti con SjS si osserva un'ampia espressione di proteine coinvolte nel danno tissutale sia come effettori del danno che come fattori di protezione nei confronti del danno tissutale stesso. Tra esse è stato possibile osservare, nello studio, l'aumento dell'actina e della lipocalina-1. L'actina aumenta in maniera statisticamente significativa nei pazienti con SjS e con sindrome sicca idiopatica mentre la lipocalina-1 solo nei pazienti con SjS. L'actina è una proteina del citoscheletro contenuta in tutti gli elementi cellulari. Un aumento della concentrazione salivare dell'actina è descritto anche nei pazienti con mucositi correlate a radioterapia per neoplasie del cavo orale ed è quindi considerato come marker aspecifico di danno del cavo orale. La lipocalina-1 è, invece, una proteina che agisce come scavenger fisiologico delle molecole che derivano dalla per ossidazione lipidica ma anche come inibitore delle serin-proteasi. Il suo aumento significativo nella saliva dei pazienti con SjS rimane ancora da chiarire ed appare particolarmente interessante considerando che recentemente la lipocalina-1 è stata identificata come potenziale autoantigene nelle lacrime dei pazienti affetti da SjS (106).

VI. CONCLUSIONI

Questo studio ha permesso di caratterizzare mediante analisi proteomica il profilo proteico della saliva dei pazienti con SjS confrontando il pattern ottenuto non solo con quello dei controlli sani ma anche rispetto ai diversi pattern di un gruppo eterogeneo di controlli patologici: pazienti con flogosi cronica del cavo orale ad eziologia non immune, pazienti con malattia autoimmune sistemica e pazienti con profilo autoanticorpale patologico analogo a quello dei pazienti con sindrome di Sjogren ma asintomatici per quanto relativo alla secchezza orale e oculare. I risultati ottenuti, seppure preliminari, hanno mostrato come il profilo proteico salivare dei pazienti con SjS risulti estremamente complesso e presenti aspetti peculiari che in parte riflettono l'impegno flogistico selettivo da parte della malattia delle ghiandole salivari, in parte riflettono le alterazioni del microambiente orale che essa induce e in parte, infine, la natura autoimmune sistemica della SjS. L'analisi a confronto delle modificazioni subite dal pattern proteico salivare normale, nella SjS e nelle altre diverse situazioni patologiche, ha permesso di focalizzare l'attenzione, in particolare, su 15 proteine (albumina, amilasi, proteina inducibile la prolattina, cheratina 6 L, carbonato deidrogenasi VI, cistatina SN, S, D, inibitore dell'elastasi leucocitaria, actina, lipocalina, ciclofillana A, calgranulina B, beta-2-microglobulina e catena leggera kappa delle Ig) e di speculare sull'eziopatogenesi delle modificazioni osservate.

Complessivamente nella SjS si osserva una marcata riduzione delle proteine a secrezione acinare (albumina, amilasi, proteina inducibile la prolattina, cheratina 6 L, carbonato deidrogenasi VI), una riduzione delle cistatine ed un incremento delle proteine inibitrici delle serin proteasi, un aumento delle proteine infiammatorie e delle proteine legate al danno tissutale (actina) ma soprattutto, in maniera specifica, un incremento nell'espressione della beta-2-microglobulina e della catena leggera kappa delle immunoglobuline, riconducibili all'attivazione B cellulare a livello ghiandolare ed un incremento della lipocalina, proteina scavenger, sospettata di svolgere ruolo di autoantigene a livello lacrimale. L'insieme delle alterazioni osservate suggerisce che il dosaggio dei livelli salivari di un numero limitato di proteine, identificate tramite analisi proteomica, possa costituire un valido ausilio nella diagnosi di malattia, configurando una sorta di algoritmo proteico da applicare soprattutto nei casi che rimangono dubbi nelle indagini di diagnostica tradizionale. In conclusione, quindi, seppure a livello preliminare, lo studio ha mostrato come l'analisi proteomica di fluidi biologici, scarsamente complessi

e facilmente reperibili come la saliva, possa rappresentare un'arma utile ed efficace nella diagnosi delle malattie reumatiche, in generale, e della SjS in particolare.

VII. BIBLIOGRAFIA

1. Ramos-Casals M., Tzioufas AG., Font J. Primary Sjogren's syndrome: new clinical and therapeutic concepts. *Ann Rheum Dis* 2005; 64: 347-354
2. Fox RJ. Sjogren's Syndrome. *Lancet* 2005; 366:321-331
3. Thomas E., Hay EM., Hajeer A., Silman AJ. Sjogren's syndrome: a community-based study of prevalence and impact. *Br J Rheumatol* 1998; 37: 1069-1076
4. Pillemer SR., Matteson EL., Jacobsson LT. Incidence of Physician-diagnosed primary Sjogren's syndrome in residents of Olmsted County, Minnesota. *Mayo Clin Proc* 2001; 76; 593-99
5. Bowman SJ., Ibrahim GH., Holmes G., Hamburger J., Ainsworth JR. Estimating the prevalence among Caucasian women of primary Sjogren's syndrome in two general practises in Birmingham, UK. *Scand J Rheumatol* 2004; 33:39-43
6. Trontzas PI., Andrianakos AA. Sjogren's syndrome: a population based study of prevalence in Greece. The ESORDIG study. *Ann Rheum Dis* 2005; 64: 1240-1241
7. Vitali C., Bombardieri S., Jonsson R., Moutsopoulos HM., Alexander EL, Carson SE., et al. Classification Criteria for Sjogren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. *Ann Rheum Dis* 2002; 61:554-8
8. Theander E., Manthorpe R., Jacobsson THL. Mortality and causes of death in primary Sjogren's syndrome. A Prospective cohort study. *Arthritis Rheum* 2004; 50:1262-1269
9. Arnett F. Histocompatibility typing in the rheumatic diseases: diagnostic and prognostic implications. *Med Clin North Am* 1994; 20: 371-87
10. Delaleu N, Jonsson R., Koller MM. Sjogren's syndrome. *Eur J Oral Sci* 2005; 113:101-113
11. Triantafyllopoulou A., Moutsopoulos HM. Autoimmunity and Coxsackievirus Infection in Primary Sjögren's Syndrome. *Ann N.Y. Acad Sci* 2005; 1050: 389–396
12. Skopouli FN., Moutsopoulos HM. Autoimmune epithelitis : Sjogren's syndrome. *Clin Exp Rheumatol*1994 ; 12(S11): 9-11
13. Mitsias DI, Tzioufas AG, Veiopoulou C, et al.: The Th1/Th2 cytokine balance changes with the progress of the immunopathological lesion of Sjögren's syndrome. *Clin Exp Immunol* 2002, 128:562–568.
14. Ogawa N., Ping L., Zhenjun L., Takada Y., Sugai S. Involvement of the interferon-gamma-induced T cell-attracting chemokines, interferon-gamma-inducible 10-kd protein

- (CXCL10) and monokine induced by interferon-gamma (CXCL9), in the salivary gland lesions of patients with Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 2002; 46:2730-41
15. Salomonsson S., Larsson P., Tengner P., Mellquist E., Hjelmstrom P., Wahren-Herlenius M. Expression of the B cell-attracting chemokine CXCL13 in the target organ and autoantibody production in ectopic lymphoid tissue in the chronic inflammatory disease Sjogren's syndrome. *Scand J Immunol.* 2002;55:336-42.
16. Youinou P., Daridon C., Saraux A., Devauchelle V., Pers JO. Is B-cell the conductor of the lymphocyte orchestra in the salivary glands of patients with primary Sjögren's syndrome. *Clin Exp Rheumatol* 2006; 24: 491-492.
17. Bolstad AI., Eiken HG., Rosenlund B., et al.: Increased salivary gland tissue expression of Fas, Fas ligand, cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4, and programmed cell death 1 in primary Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum* 2003; 48:174–185.
18. Fox RI., Stern M.: Sjögren's syndrome: mechanisms of pathogenesis involve interaction of immune and neurosecretory systems. *Scand J Rheumatol* 2002; 116:3–13.
19. Beroukas D., Hiscock J., Gannon BJ., et al.: Selective down-regulation of aquaporin-1 in salivary glands in primary Sjögren's syndrome. *Lab Invest* 2002; 82:1547–1552.
20. Hansen A., Lipsky PE., Dorner T. New concepts in the pathogenesis of Sjögren syndrome: many questions, fewer answers. *Curr Opin Rheumatol* 2003; 15:563–570
21. Dawson LJ., Stanbury J., Venn N., Hasdimir B., Rogers SN., Smith PM. Antimuscarinic Antibodies in Primary Sjögren's Syndrome Reversibly Inhibit the Mechanism of Fluid Secretion by Human Submandibular Salivary Acinar Cells. *Arthritis Rheum* 2006; 54: 1165–1173
22. Skopouli FN., Dafni U., Ioannidis JP., Moutsopoulos HM. Clinical evolution, and morbidity and mortality of primary Sjogren's syndrome. *Semin Arthritis Rheum* 2000; 29:296-304
23. Rolando M. Sjogren's syndrome as seen by an ophthalmologist. *Scand J Rheumatol* 2001; S115: 27-33
24. Soto-Rojas AE., Kraus A. The oral side of Sjogren's syndrome. Diagnosis and treatment. A Review. *Arch Med Research* 2002; 33:95-106
25. Hamburger J. Sjogren's syndrome as seen by an oral physician. *Scand J Rheumatol* 2001; S115: 34-39
26. Ramos-Casals M., Font J., Garcia-Carrasco M., Brito MP., Rosas J., Calvo-Alen J et al. Primary Sjogren syndrome: hematologic patterns of disease expression. *Medicine (Baltimore)* 2002; 81: 281-292

27. Tsioufas AG., Boumba DS., Skopouli FN., Moutsopoulos HM. Mixed monoclonal cryoglobulinemia and monoclonal rheumatoid factor cross-reactive idiotypes as predictive factors for the development of lymphoma in primary Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1996; 39: 767-772
28. Voulgarelis M., Dafni UG., Isenberg DA., Moutsopoulos HM. Malignant lymphoma in primary Sjogren's syndrome: a multicenter, retrospective, clinical study by the European Concerted Action on Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 1999; 42: 1765-1772
29. Baldini C., Tavoni A., Merlini G., Sebastiani M., Bombardieri S. Sindrome di Sjogren primitiva: descrizione clinica e sierologica di una casistica monocentrica. *Reumatismo*, 2005; 57(4):256-261
30. Praprotnik S., Bozic B., Kveder T., Rozman B. Fluctuation of anti-Ro/SSA antibody levels in patients with systemic lupus erythematosus and Sjogren's syndrome: a prospective study. *Clin Exp Rheumatol* 1999; 17:63-68
31. Loch H, Pelck R., Manthorpe R. Clinical manifestations correlated to the prevalence of autoantibodies in a large cohort of patients with primary Sjogren's syndrome. A comparison of patients initially diagnosed according to the Copenhagen classification criteria with the American-European consensus criteria. *Autoimmun Rev* 2005; 4:276-281
32. Meyer O. Anti-SSA/Ro and anti-SSB/La antibodies. What's new? *Ann Med Interne (Paris)*. 2002;153:520-9
33. Ulbricht KU., Schmidt RE., Witte T. Antibodies against alpha-fodrin in Sjogren's syndrome. *Autoimmun Rev* 2003; 2: 109-113
34. Vitali C, Bombardieri S., Moutsopoulos HM., Balestrieri G., Bencivelli W., Bernstein RM., Bjerrum KB., Braga S., Coll J., de Vita S., et al. Preliminary criteria for the classification of Sjogren's syndrome. Results of a prospective concerted action supported by the European Community. *Arthritis Rheum* 1993; 36:340- 347.
35. Vitali C., Moutsopoulos HM., Bombardieri S. The European Community Study Group on diagnostic criteria for Sjogren's syndrome. Sensitivity and specificity of tests for ocular and oral involvement in Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 1994; 53: 637-647
36. Vivino FB., Gala I. Hermann GA. Change in Final Diagnosis on Second Evaluation of Labial Minor Salivary Gland Biopsies. *J. Rheumatol* 2002; 29: 938-944
37. Greenspan JS, Daniels TE, Talal N, Sylvester RA. The histopathology of Sjogren's syndrome in labial salivary gland biopsies. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1974; 37: 217-229

38. Daniels TE. Labial salivary gland biopsy in Sjogren's syndrome. Assessment as a diagnostic criterion in 362 suspected cases. *Arthritis Rheum* 1984; 27:147-156
39. Pijpe J., Kalk WWI., Bootsma H., Spijkervet FKL., Kallenberg CGM., Vissink A. Progression of salivary gland dysfunction in patients with Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 2007;66: 107-112
40. Stuchell RN., Mandel ID., Baumhart H. Clinical utilization of sialochemistry in Sjogren's syndrome. [J Oral Pathol](#). 1984;13:303-309
41. Cuida M., Halse AK., Johannessen AC., Tynning T., Jonsson R. Indicators of salivary gland inflammation in primary Sjogren's syndrome. *Eur J Oral Sci*. 1997;105:228-33.
42. van der Reijden WA., van der Kwaak JS., Veerman EC., Nieuw Amerongen AV. Analysis of the concentration and output of whole salivary constituents in patients with Sjogren's syndrome. *Eur J Oral Sci*. 1996;104: 335-340
43. Moutsopoulos HM, Karsh J, Wolf RO, Tarpley TM, Tylden A, Papadopoulos NM. Lysozyme determination in parotid saliva from patients with Sjogren's syndrome. *Am J Med* 1980; 69:39-42
44. Jezequel N., Depasse F., Jouquan J., Lelong A., Roncin S., Pare G., Pennec YL., Youinou P. Salivary lactoferrin in primary Sjogren's syndrome. *Clin Exp Rheumatol*. 1989;7:123-5
45. Sreebny L., Zhu WX. Whole saliva and the diagnosis of Sjogren's syndrome: an evaluation of patients who complain of dry mouth and dry eyes. Part 1: Screening tests. *Gerodontology*. 1996;13:35-43
46. Wu AJ, Lafrenie RM, Park C et al. Modulation of MMP-2 (gelatinase A) and MMP-9 (gelatinase B) by interferon-gamma in a human salivary gland cell line. *J Cell Physiol* 1997;171:117-24.
47. Hernandez CC, Donadi EA, Reis ML. Kininogen-kallikrein-kinin system in plasma and saliva of patients with Sjogren's syndrome. *J Rheumatol* 1998;25:2381-4.
48. Kalk WWI., Vissink A., Stegenga B., Bootsma H., Nieuw Amerongen AV., Kallenberg CGM. Sialometry approach for diagnosing Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 2002;61;137-144
49. Choudhary J., Grant SGN. Proteomics in postgenomic neuroscience: the end of the beginning. *Nature Neuroscience* 2004; 5: 440-445.
50. Godovac-Zimmermann J., Soskic V., Poznanovic S., Brianza F. Functional proteomics of signal transduction by membrane receptors. *Electrophoresis* 1999; 20: 952-961.

51. Imam-Sghiouar N., Laude-Lemaire I., Labas V., Pflieger D., Le Caer JP., Caron M., Nabias DK., Joubert-Caron R. Subproteomics analysis of phosphorylated proteins: application to the study of B-lymphoblast from a patient with Scott syndrome. *Proteomics* 2002; 2: 828-838.
52. Graves PR., Haystead ATJ. *Molecular Biologist's Guide to Proteomics Microbiology and Molecular Biol Rev* 2002; 66: 39-63
53. Pandey A., Mann M. Proteomics to study genes and genomes. *Nature* 2000; 405: 837-846.
54. Phizicky E., Bastiaens PI., Zhu H., Snyder M., Fields S. Protein analysis on a proteomic scale. *Nature* 2003; 422: 208-215.
55. Berkelman T., Stenstedt T. 2-D Electrophoresis, using immobilized pH gradients. *Principles and Methods. Amersham Biosciences* 2002; 17-22.
56. Klose J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutation in mammals. *Humangenetik* 1975; 26: 231-243.
57. Gorg A., Postel W., Gunther S., Weser J. Improved horizontal two-dimensional electrophoresis with hybrid isoelectric focusing in immobilized pH gradients in the first dimension and laying-on transfer to the second dimension. *Electrophoresis* 1985; 6: 599-604.
58. Sanchez JC., Rouge V., Pisteur M., Ravier F., Tonella L., Moosmayer M., Wilkins MR., Hochstrasser DF. "Improved and simplified in-gel sample application using reswelling of dry immobilized pH gradients". *Electrophoresis* 1997; 18: 324-327.
59. Candiano G., Bruschi M., Musante L., Santucci L., Ghiggeri GM., Carnemolla B., Orecchia P., Zardi L., Righetti PG. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis* 2004; 25: 1327-1333.
60. Wilkins MR., Williams KL., Appeal RD., Hochstrasser DF. *Proteome research: new frontiers in functional genomics. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg* 1997; 1-12.
61. Godovac-Zimmermann J., Brown L. *Perspectives for Functional Proteomics and Mass Spectrometry. Mass. Spec. Reviews*, 2001, 20: 1-57
62. Aebersold R., Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 2003; 422: 198-207
63. Fusaro VA., Stone JH. Mass spectrometry-based proteomics and analyses of serum: a primer for the clinical investigator. *Clin Exp Rheumatol.* 2003; 21(S32):S3-14

64. Westermier R., Loland S., Asbury R. La tecnologia proteomica. *Journal of Clinical ligand assay*. 2002. 25: 250-260
65. Bonk T., Humeny A. MALDI-TOF-MS Analysis of Protein and DNA. *The Neuroscientist* 2001; 1: 6-12
66. Langen H., Berndt P., Roder D., Cairns N., Lubec G., Fountoulakis M. Two-dimensional map of human brain proteins". *Electrophoresis* 1999; 20: 907-916.
67. Husi H., Grant SGN. Proteomics of the nervous system. *Trends in Neurosciences* 2001; 5: 259-266
68. Humphrey SP., Williamson RT. A review of saliva: Normal composition, flow, and function. *The journal of prosthetic dentistry* 2001; 85: 162-169.
69. Amado FML., Vitorino RMP., Domingues PMDN., Lobo MJC., Duarte JAR. Analysis of the human saliva proteome. *Expert Rev Proteomics* 2005; 2:521-539
70. Kaufman E., Lamster IB. The diagnostic application of saliva-a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002; 13: 197-212.
71. Drake RR., Cazare LH., Semmes OJ., Wadsworth JT. Serum, salivary and tissue proteomics for discovery of biomarkers for head and neck cancers. *Expert Rev Mol Diagn.* 2005;5:93-100.
72. Huang CM. Comparative proteomic analysis of human whole saliva. *Arch Oral Biol* 2004; 49: 951-962
73. Vitorino R., Lobo M. J., Ferrer-Correira A. J., Dubin, J. R., Tomer K. B., Domingues, P. M., Amado F. M. Identification of human whole saliva protein components using proteomics. *Proteomics* 2004; 4: 1109 -1115
74. Hirtz C., Chevalier F., Centeno D., Egea JC., Rossignol M., Sommerer N., de Périère D. Complexity of the human whole saliva proteome. *J Physiol Biochem* 2005; 61: 469-480
75. Yao Y., Berg EA., Costello CE., Troxler RF, Oppenheim FG Identification of Protein Components in Human Acquired Enamel Pellicle and Whole Saliva Using Novel Proteomics Approaches 2003; 278: 5300-5308
76. Kojima T., Andersen E., Sanchez J. C., Wilkins M. R., Hochstrasser D. F., Pralong W. F., Cimasoni G. Human gingival crevicular fluid contains MRP8 (S100A8) and MRP14 (S100A9), two calcium-binding proteins of the S100 family. *J Dent. Res.* 2000; 79: 740-747.
77. Hardt M, Thomas LR., Dixon SE., Newport G., Agabian N., Prakobphol A., Hall SC., Witkowska HE., Fisher SJ. Toward Defining the Human Parotid Gland Salivary Proteome

and Peptidome Identification and Characterization Using 2D SDS-PAGE, Ultrafiltration, HPLC and Mass Spectrometry. *Biochemistry* 2005; 44: 2885-2899

78. Hu S., Denny P., Xie Y., Loo JA., Wolinsky LE., Li Y., McBride J., Ogorzalek Loo RR., Navazesh M., Wong DT. Differentially expressed protein markers in human submandibular and sublingual secretions. *Int J Oncol* 2004; 25:1423-30.

79. Yang LL., Liu XQ., Liu W., Cheng B., Li MT. Comparative analysis of whole saliva proteomes for the screening of biomarkers for oral lichen planus. *Inflamm Res* 2006; 55:405-7

80. Wong DT. Salivary diagnostics for oral cancer. *J Calif Dent Assoc* 2006;34:303-8

81. Ryu OH., Atkinson JC., Hoehn GT., Illei GG., Hart TC. Identification of parotid salivary biomarkers in Sjogren's syndrome by surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and two-dimensional difference gel electrophoresis. *Rheumatology (Oxford)* 2006;45:1077-86.

82. Hermansson M., Sawaji Y., Bolton M., Alexander S., Wallace A., Begum S., Wait R., Saklatvala J. Proteomic analysis of articular cartilage shows increased type II collagen synthesis in osteoarthritis and expression of inhibin betaA (activin A), a regulatory molecule for chondrocytes. *J Biol Chem* 2004; 279:43514-21

83. De Ceuninck F., Marcheteau E., Berger S., Caliez A., Dumont V., Raes M., Anract P., Leclerc G., Boutin JA., Ferry G. Assessment of some tools for the characterization of the human osteoarthritic cartilage proteome. *J Biomol Tech* 2005;16: 256-65.

84. Ruiz-Romero C., Lopez-Armada MJ., Blanco FJ. Proteomic characterization of human normal articular chondrocytes: a novel tool for the study of osteoarthritis and other rheumatic diseases. *Proteomics* 2005;5:3048-59.

85. Sinz A., Bantscheff M., Mikkat S., Ringel B., Drynda S., Kekow J., Thiesen HJ, Glocker MO. Mass spectrometric proteome analyses of synovial fluids and plasmas from patients suffering from rheumatoid arthritis and comparison to reactive arthritis or osteoarthritis. *Electrophoresis* 2002; 23:3445-56

86. Liao H., Wu J., Kuhn E., Chin W., Chang B, Jones MD., O'Neil S., Clauser KR., Karl J., Hasler F., Roubenoff R., Zolg W., Guild BC. Use of mass spectrometry to identify protein biomarkers of disease severity in the synovial fluid and serum of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2004;50:3792-803

87. Drynda S., Ringel B., Kekow M., Kuhne C., Drynda A., Glocker MO., Thiesen HJ., Kekow J. Proteome analysis reveals disease-associated marker proteins to differentiate RA

- patients from other inflammatory joint diseases with the potential to monitor anti-TNFalpha therapy. *Pathol Res Pract* 2004;200:165-71
88. de Seny D., Fillet M., Meuwis MA., Geurts P., Lutteri L., Ribbens C., Bours V., Wehenkel L., Piette J., Malaise M., Merville MP. Discovery of new rheumatoid arthritis biomarkers using the surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry ProteinChip approach. *Arthritis Rheum* 2005; 52:3801-12
89. An Y., Pu H., He SZ., Li ZG. Identification of biomarkers in serum of early rheumatoid arthritis by proteomic methods *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2005;85:1261-5
90. Tilleman K., Van Beneden K., Dhondt A., Hoffman I., De Keyser F., Veys E., Elewaut D., Deforce D. Chronically inflamed synovium from spondyloarthropathy and rheumatoid arthritis investigated by protein expression profiling followed by tandem mass spectrometry. *Proteomics*. 2005; 5:2247-57
91. Miyamae T., Malehorn DE., Lemster B., Mori M., Imagawa T., Yokota S., Bigbee WL., Welsh M., Klarskov K., Nishimoto N, Vallejo AN., Hirsch R. Serum protein profile in systemic-onset juvenile idiopathic arthritis differentiates response versus nonresponse to therapy. *Arthritis Res Ther* 2005;7:R746-55.
92. Tomosugi N., Kitagawa K., Takahashi N., Sugai S., Ishikawa I. Diagnostic potential of tear proteomic patterns in Sjogren's syndrome. *J Proteome Res* 2005;4:820-5.
93. Stone JH., Rajapakse VN., Hoffman GS., Specks U., Merkel PA., Spiera RF., Davis JC., St Clair EW., McCune J., Ross S., Hitt BA., Veenstra TD., Conrads TP., Liotta LA., Petricoin EF 3rd; Wegener's Granulomatosis Etanercept Trial Research Group. A serum proteomic approach to gauging the state of remission in Wegener's granulomatosis. *Arthritis Rheum* 2005;52:902-910.
94. Fietta A., Bardoni A., Salvini R., Passadore I., Morosini M., Cavagna L., Codullo V., Pozzi E., Meloni F., Montecucco C. Analysis of bronchoalveolar lavage fluid proteome from systemic sclerosis patients with or without functional, clinical and radiological signs of lung fibrosis. *Arthritis Res Ther*. 2006; 8:R160
95. Atzeni F., Bardoni A., Cutolo M., Hunzelmann N., Krieg T., Martini G., Montecucco C., Olski TM., Secchi ME., Valentini G., Zulian F., Sarzi-Puttini P. Localized and systemic forms of scleroderma in adults and children. *Clin Exp Rheumatol* 2006; 24 (S 40):S36-45
96. Denton CP., Black CM., Abraham DJ. Mechanisms and consequences of fibrosis in systemic sclerosis. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2006; 2:134-144
97. Hummers LK. Microvascular damage in systemic sclerosis: detection and monitoring with biomarkers. *Curr Rheumatol Rep* 2006;8:131-137

98. Mason GI., Hamburger J., Matthews JB. Mast cells, extracellular matrix components, TGF β isoforms and TGF β receptor expression in labial salivary glands in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2000; 59:183-189
99. Chisolm DM et al. Labial salivary gland biopsy in Sjogren's syndrome. *Clin Pathol* 1968; 21:656-60
100. Subcommittee for Scleroderma Criteria of the American Rheumatism Association Diagnostic and therapeutic Criteria Committee. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum* 1980; 23: 581-590
101. Peterson GL. Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. *Anal Biochem* 1979; 100: 201-220
102. Baldini C., Giusti L., Bazzichi L., Lucacchini A., Ciregia F., Tavoni A., Bombardieri S.. Analisi Proteomica della saliva nei pazienti con Sindrome di Sjogren primitiva. *Reumatismo* 2006, 58(3)
103. Giusti L, Baldini C, Bazzichi L., Ciregia F., Tonazzini I., Mascia G., Giannaccini G., Bombardieri S., Lucacchini A. Siena Proteomics Proceedings. Proteome analysis of whole saliva: a new tool for rheumatic diseases - the example of Sjögren's syndrome. in press
104. Mirels L., Hand AR., Branin HJ. *J Histochem Cytochem* 1998; 46: 1061-1071
105. Kivela J., Parkkila S., Parkkila AK., Leinonen J., Rajaniemi H. Salivary carbonic anhydrase isoenzyme Vi. *J Physiol* 1999; 520: 315-320
106. Navone R., Lunardi C., Gerli R., Tinazzi E., Peterlana D., Bason C., Corrocher R., Puccetti A. Identification of tear lipocalin as a novel autoantigen target in Sjogren's syndrome. *J Autoimmun* 2005; 25: 229-234.

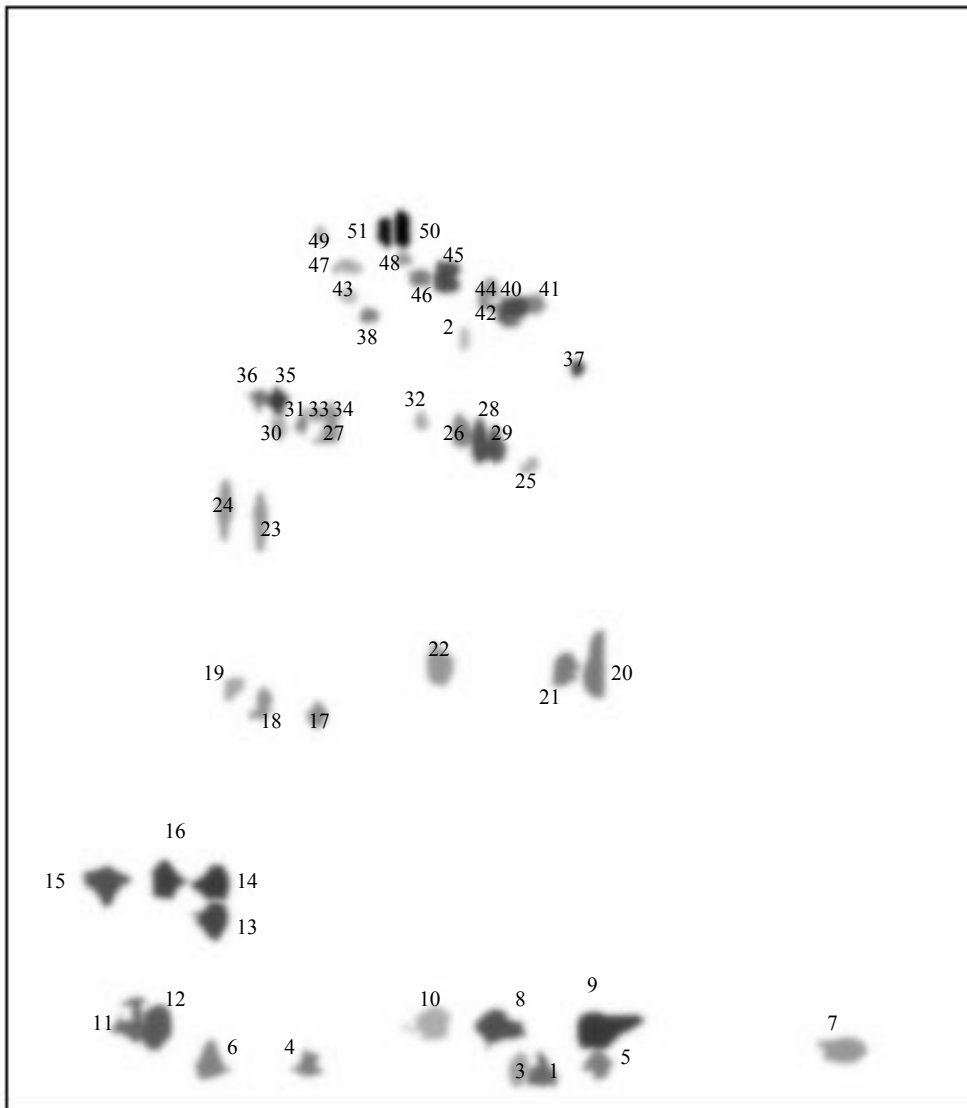


Figura 6: Gel sintetico controllo sano

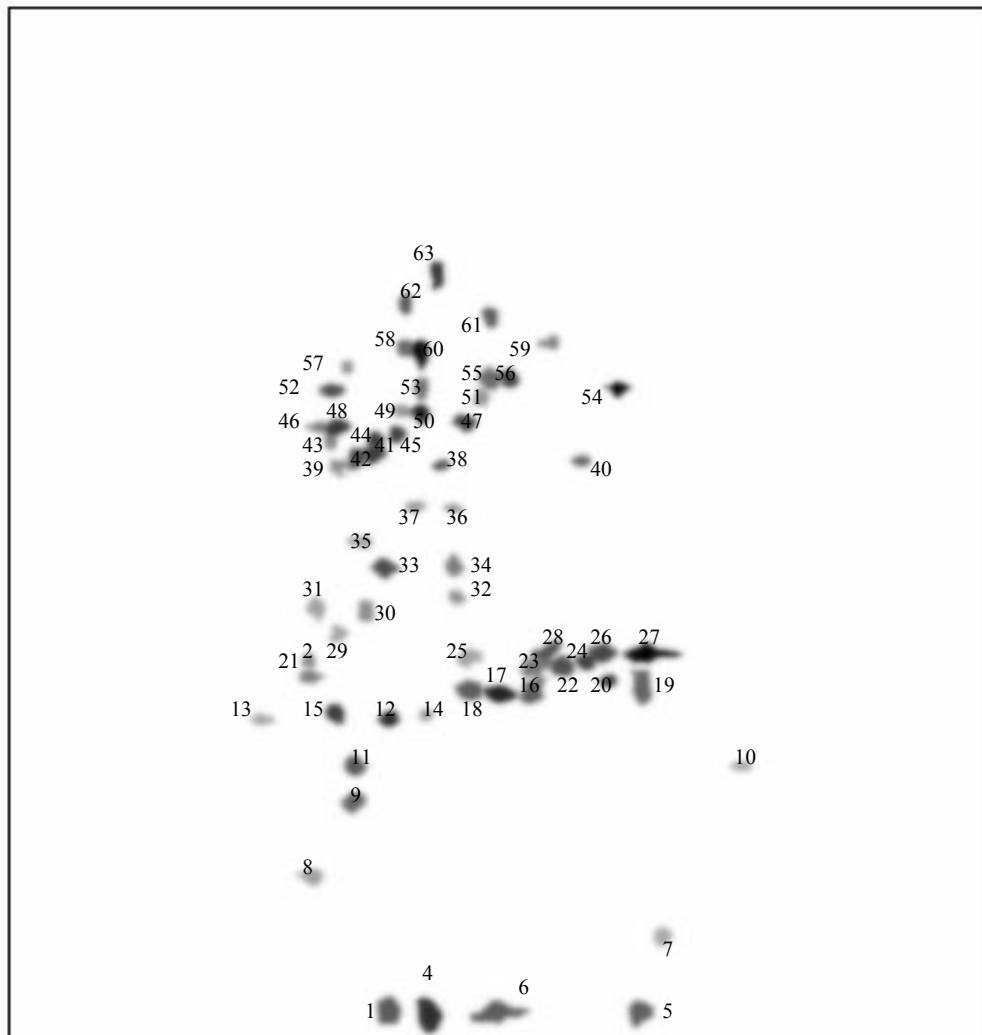


Fig 7: Gel sintetico Sindrome di Sjogren

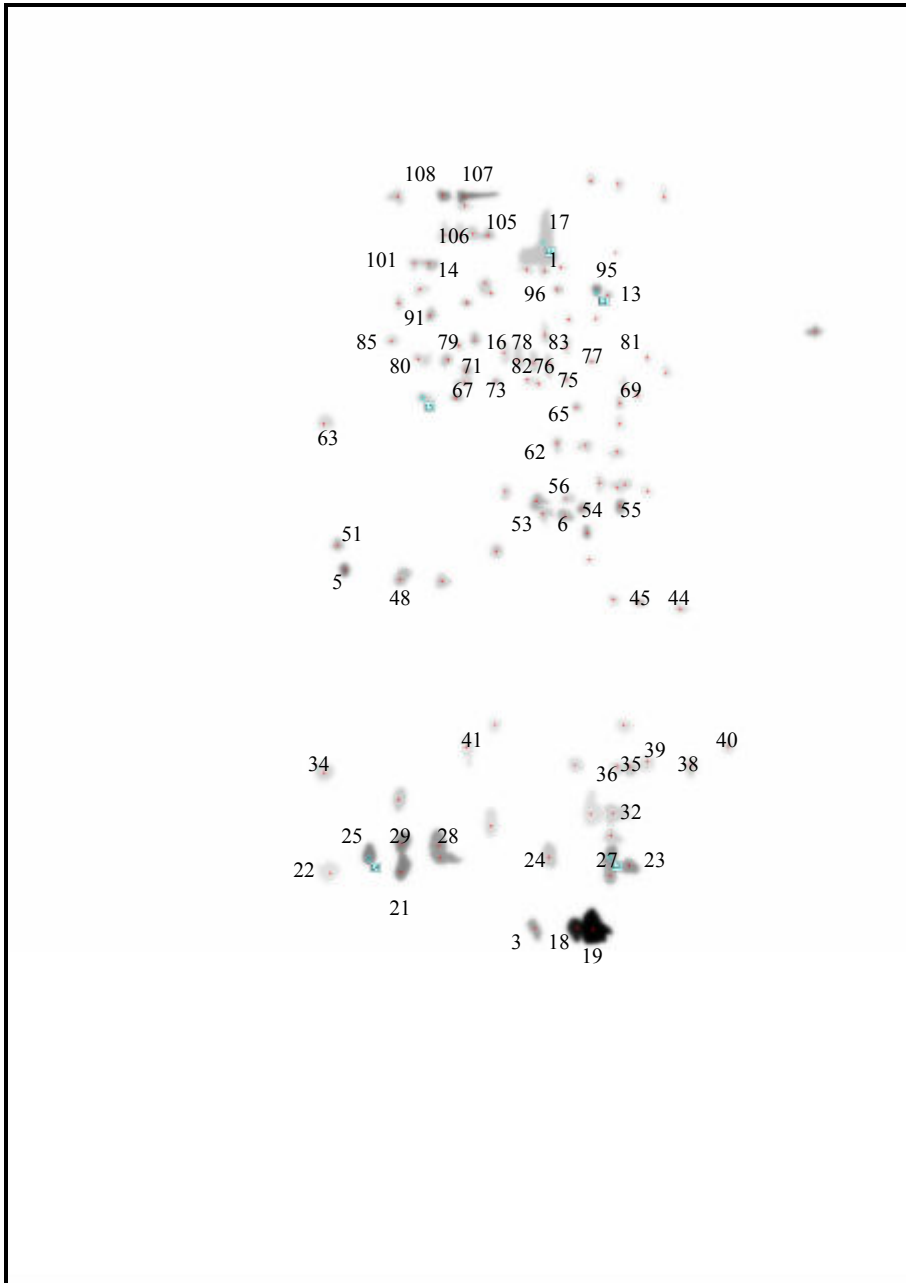


Fig 8: Gel sintetico Sindrome Sicca Idiopatica

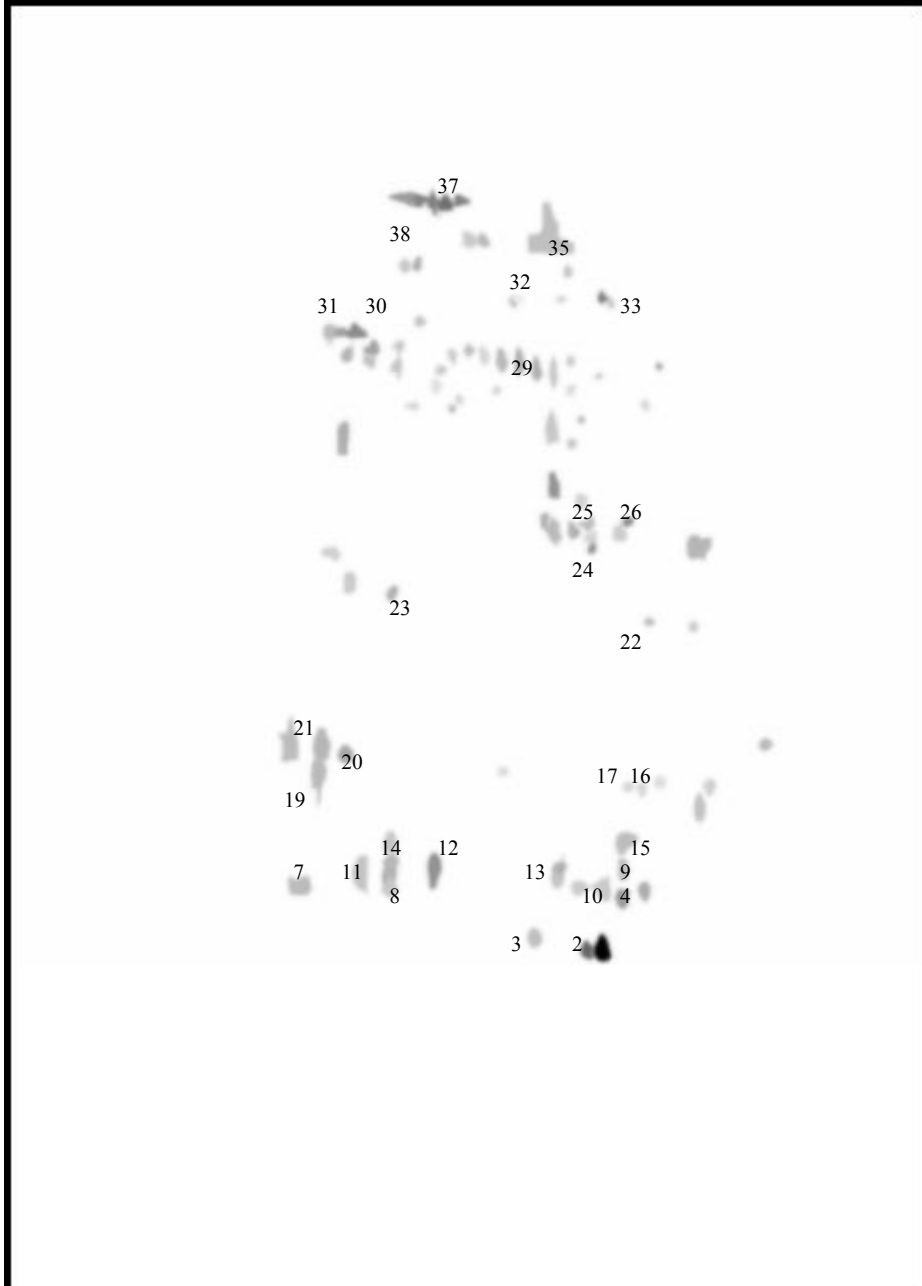


Fig 9: Gel sintetico pazienti con anticorpi anti-Ro/SSA

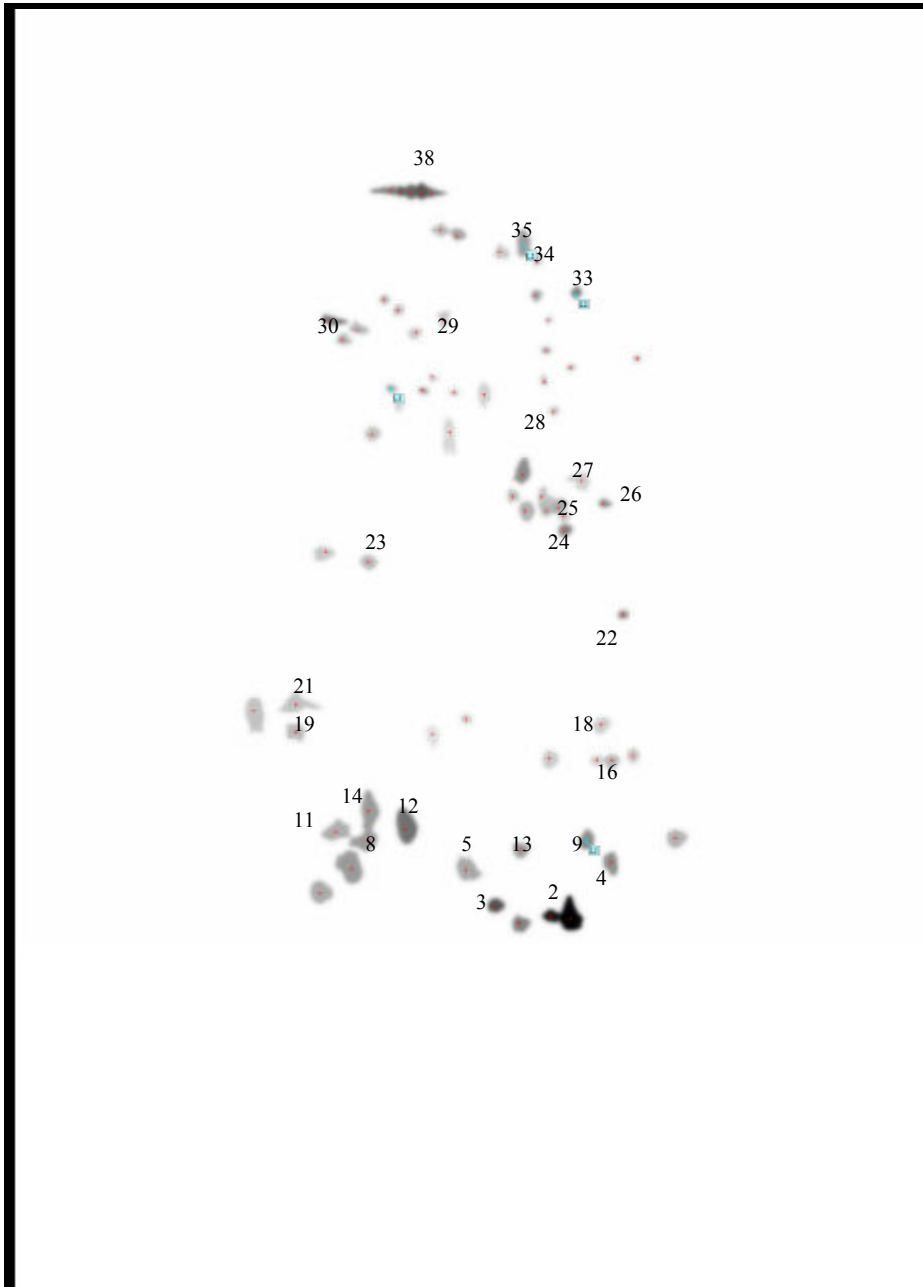


Fig 10: Gel sintetico pazienti con anticorpi anti- Ro/SSA e anti-La/SSB

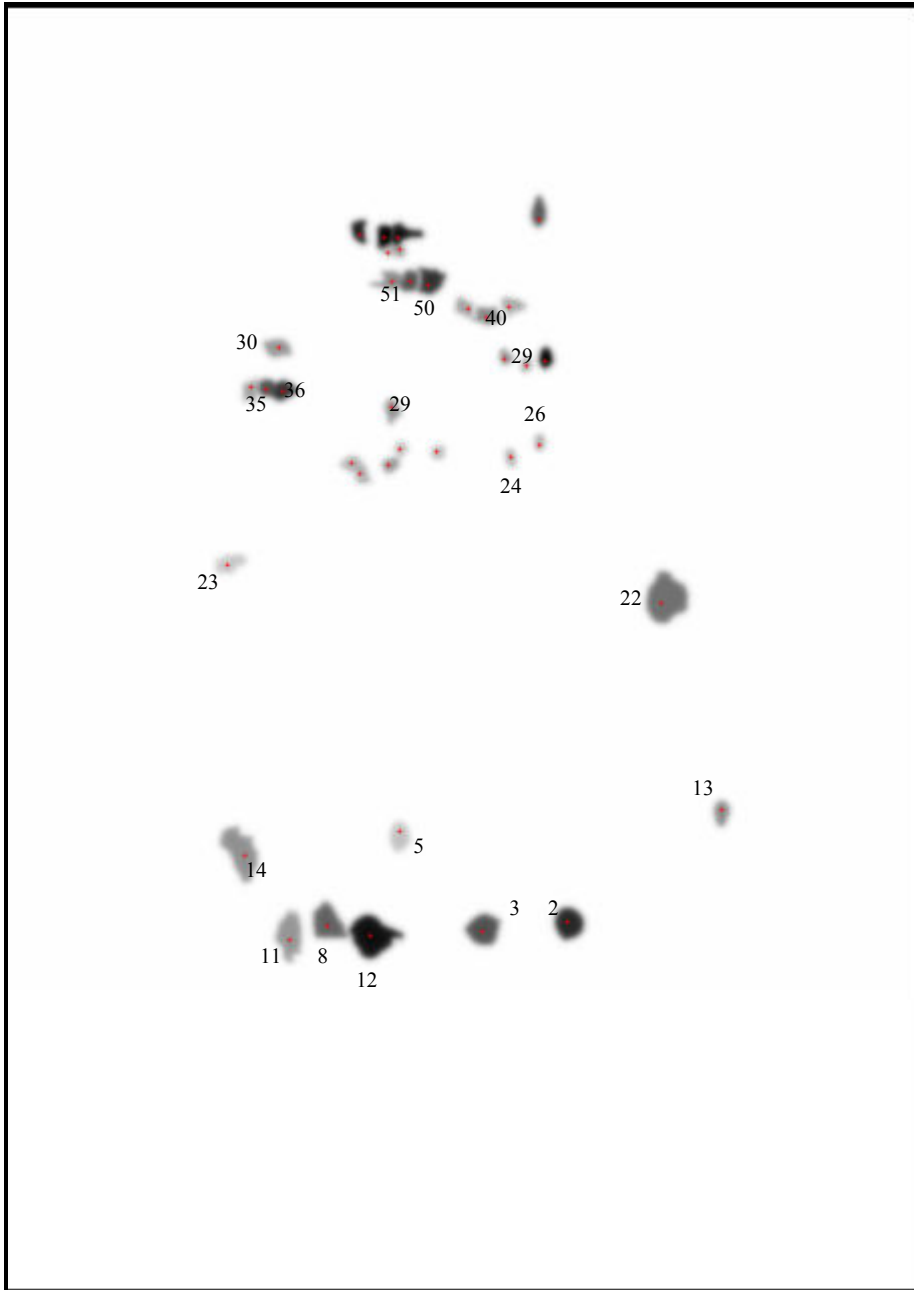


Fig 11. Gel sintetico Sclerosi Sistemica Progressiva

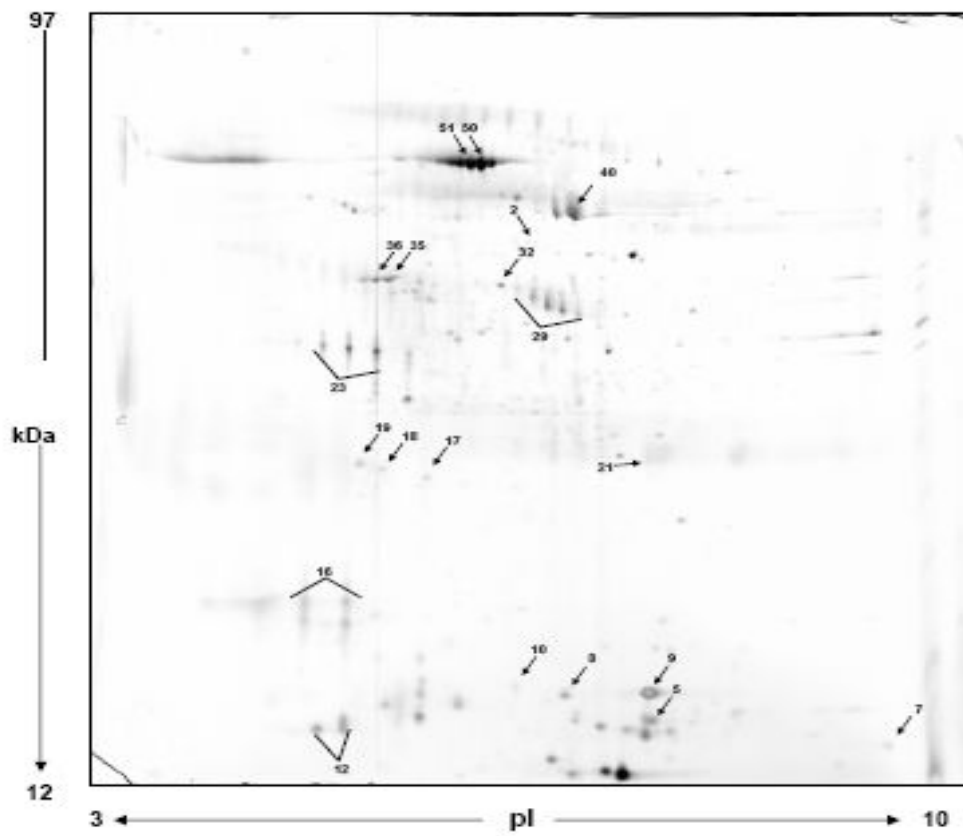


Fig 12: Gel rappresentativo controllo sano

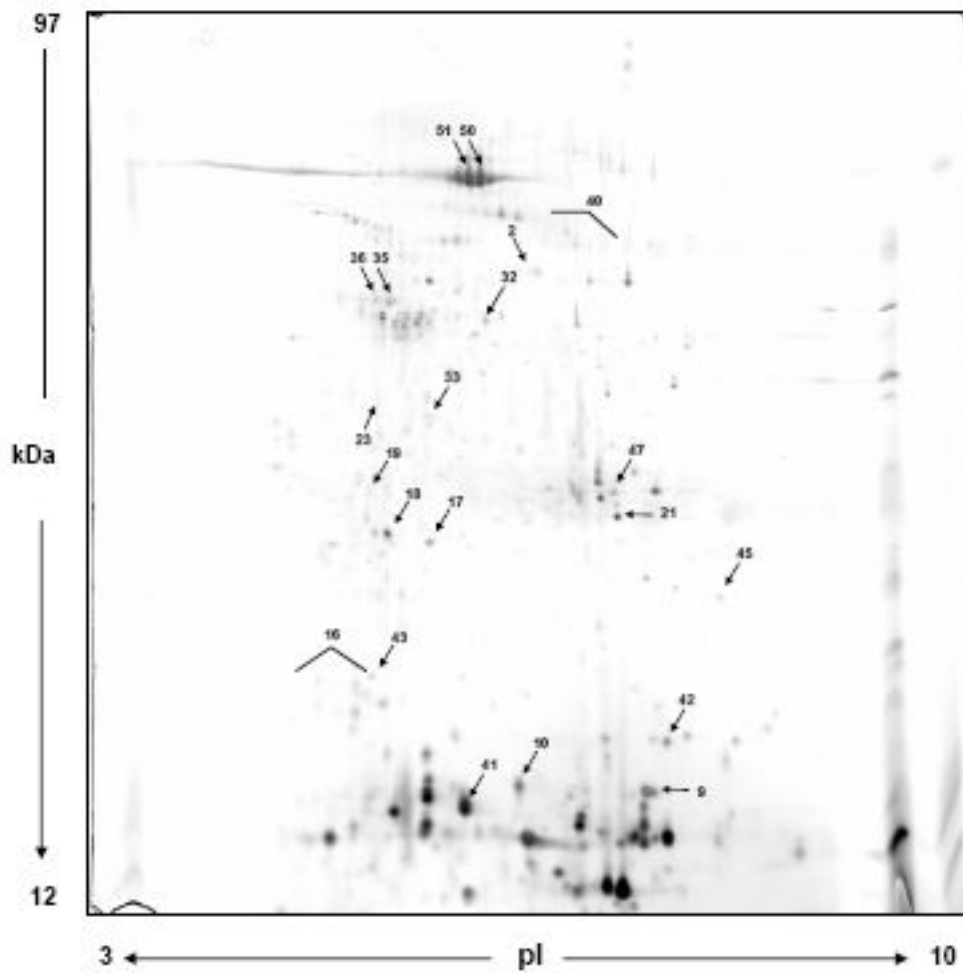


Fig 13: Gel rappresentativo Sindrome di Sjogren

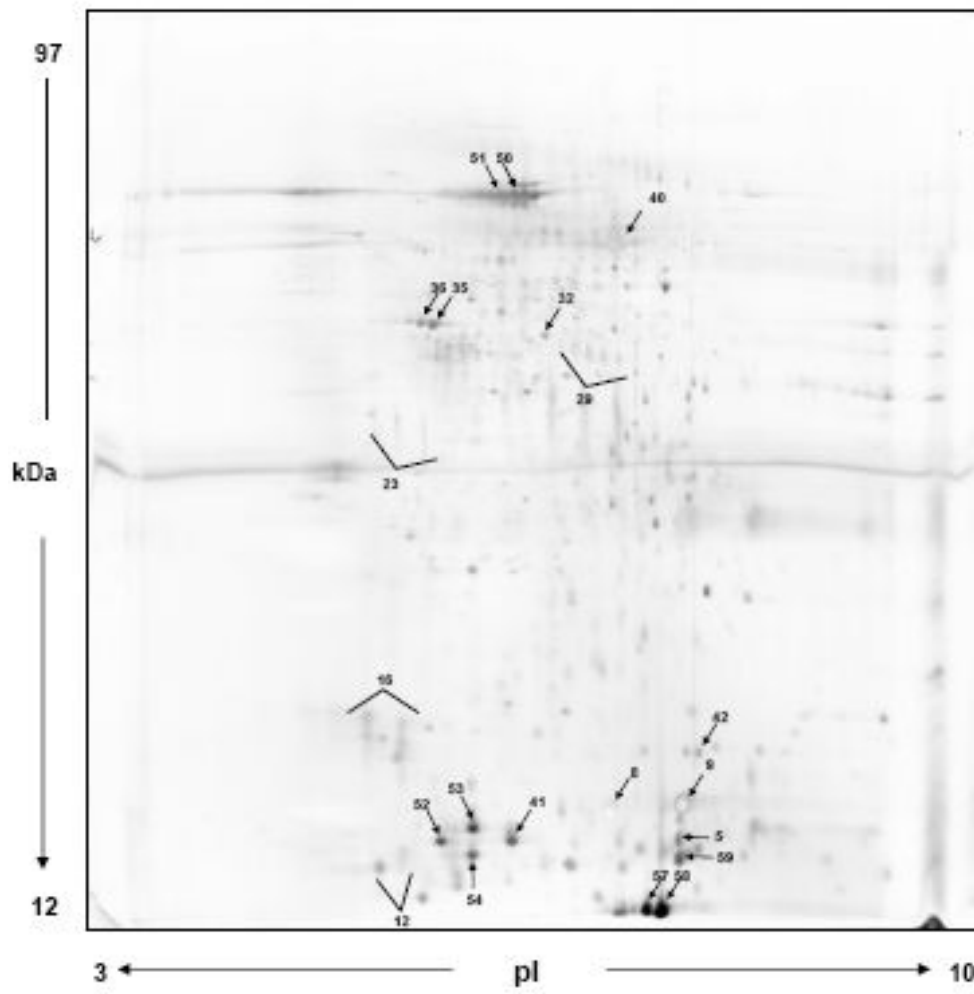


Fig 14: Gel rappresentativo Sindrome Sicca Idiopatica

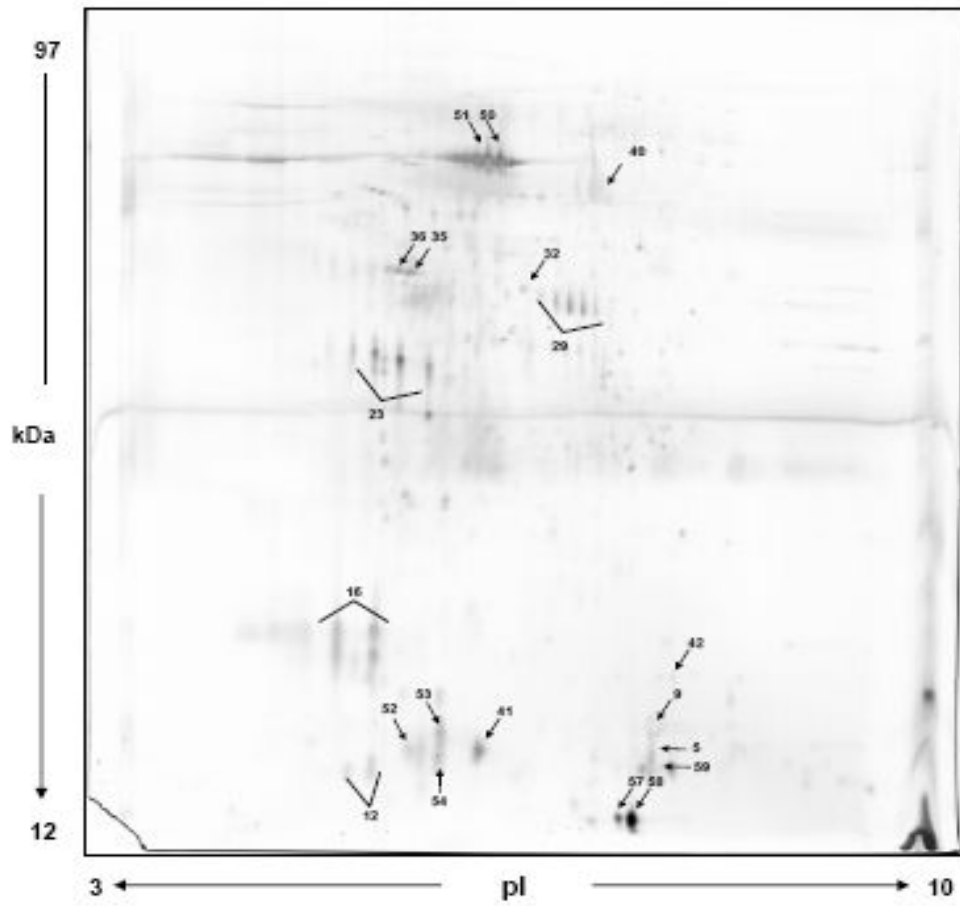


Fig 15: Gel rappresentativo dei pazienti con anticorpi anti-Ro/SSA

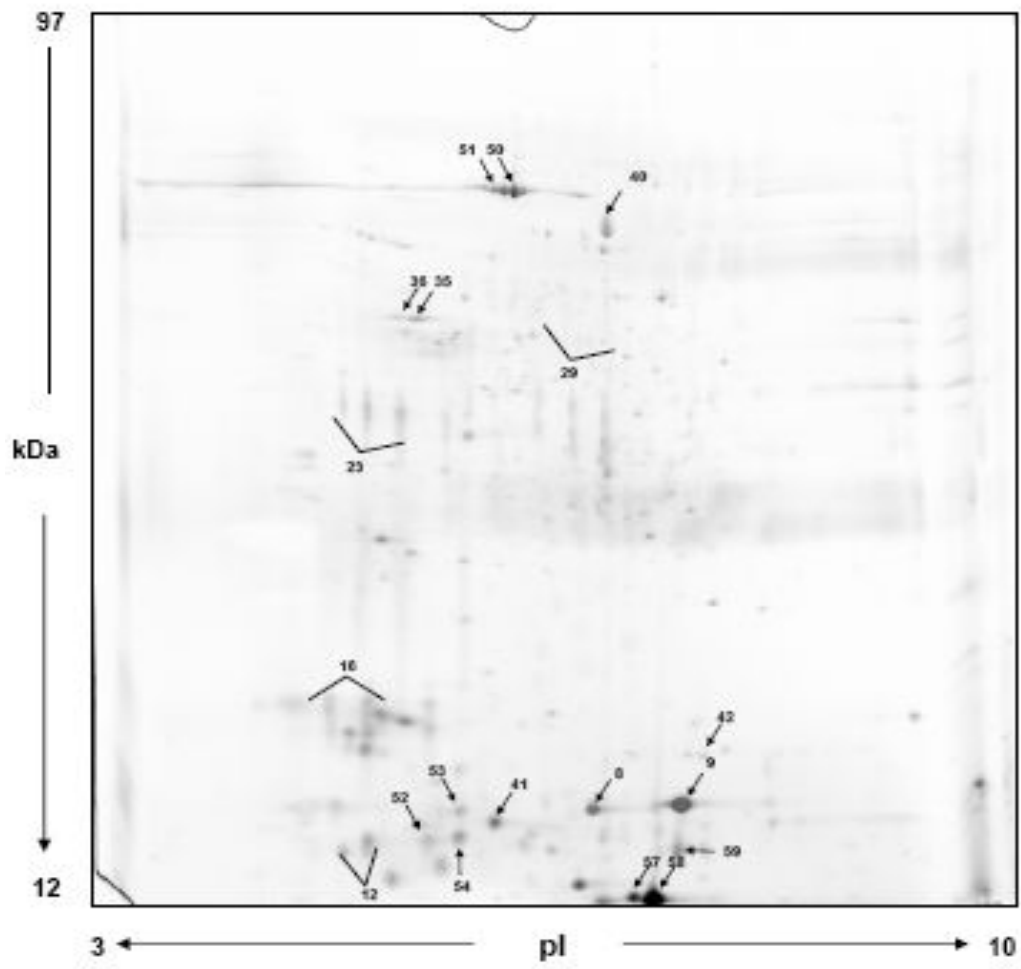


Fig 16: Gel rappresentativo pazienti con anticorpi anti-Ro/SSA e anti-La/SSB

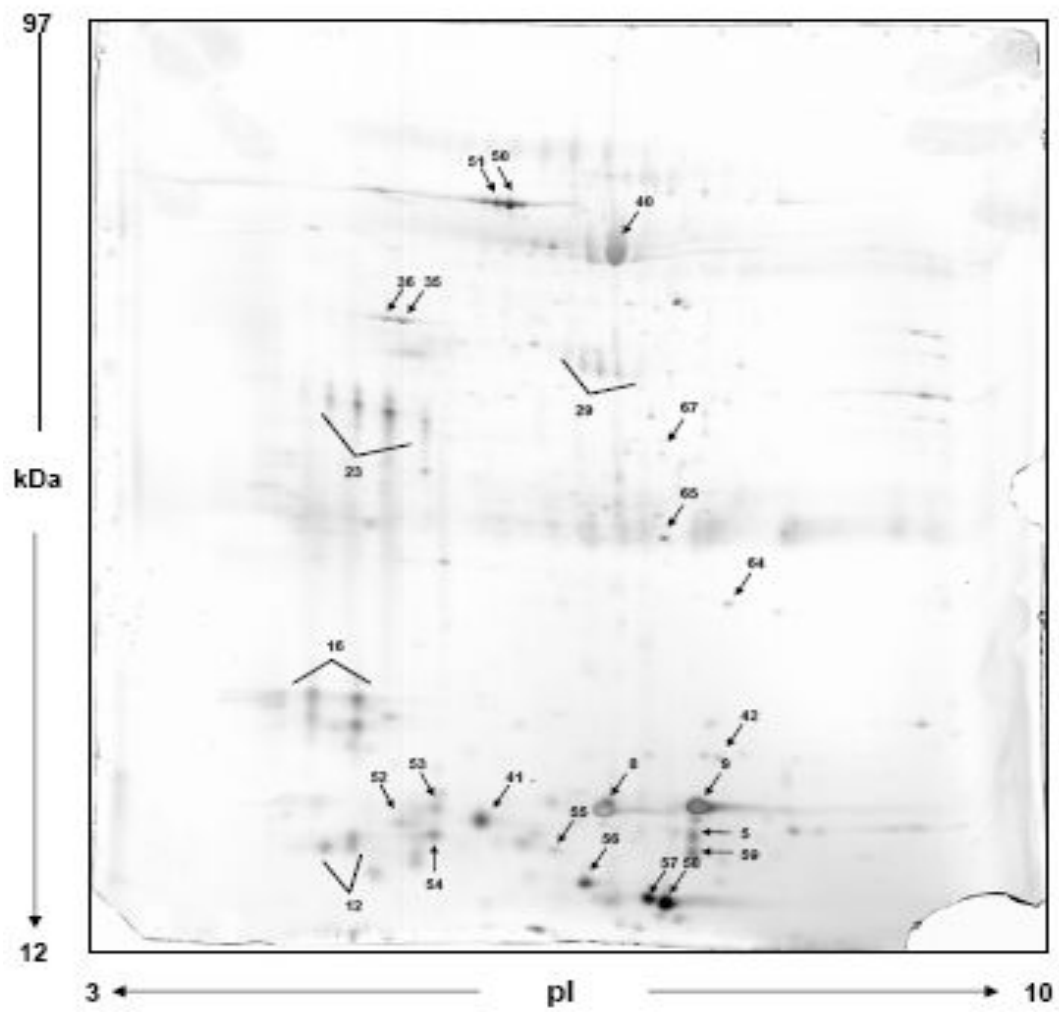


Fig 17: Gel rappresentativo Sclerosi Sistemica Progressiva