

LAVORO ORIGINALE

Anomalie cromosomiche, valutate come frequenza di micronuclei spontanei, in soggetti con fenomeno di Raynaud sospetto presclerodermico*

*Chromosome aberrations, valued as frequency of spontaneous micronuclei,
in subjects with suspected presclerodermic Raynaud's phenomenon*

G. Porciello, R. Scarpato¹, F. Storino², F. Cagetti¹, F. Bellisai, G. Morozzi, R. Marcolongo,
L. Migliore¹, C. Ferri², M. Galeazzi

Istituto di Reumatologia, Università di Siena. ¹Dip. di Scienze dell'Uomo e dell'Ambiente, e ²Istituto di Reumatologia, Università di Pisa

SUMMARY

Objective: To evaluate the prevalence of spontaneous chromosome damage in cultured peripheral lymphocytes of subjects with suspected presclerodermic Raynaud's phenomenon (RP), by means of molecular cytogenetic analysis.

Methods: We studied 20 suspected presclerodermic RP, 20 idiopathic RP and 25 healthy subjects. As marker of chromosome alteration we used the micronucleus assay. All subjects were also classified as ANA-, ACA+ or Scl70+. To identify the mechanism of MN formation, a MN fluorescence in situ hybridisation (FISH) analysis using a pancentromeric DNA probe was also performed.

Results: Suspected presclerodermic RP subjects, showed significantly higher MN frequencies than idiopathic RP and controls (39 ± 15.2 vs 10 ± 2.1 and 9.8 ± 3.5 respectively $p < 0.0001$). Interestingly, subjects with idiopathic RP displayed MN frequency comparable to that of controls. Furthermore, ACA+ subjects showed the highest MN frequencies (44 ± 8.1) as compared to subjects with different antibody pattern (26 ± 7.1).

Conclusions: Our results show the presence of higher levels of chromosomal damage in circulating lymphocytes of suspected presclerodermic RP. They also would suggest a key role of anti-centromere antibody in determining the observed cytogenetic anomalies. FISH analysis indicated that both aneuploidogenic and clastogenic events contribute to the formation of MN observed in suspected presclerodermic RP.

Reumatismo, 2003; 55(1):28-33

INTRODUZIONE

In letteratura esistono numerose segnalazioni che dimostrano la presenza di alterazioni cromosomiche (rottture, fenomeni di aneuploidia), sia indotte (radiazioni, farmaci, sostanze tossiche) che spontanee, in pazienti con Sclerosi sistemica (ScS) (1-5, 26), mentre per quanto riguarda il fenomeno di Raynaud (fR), che è spesso una delle manifestazioni più precoci della ScS, esistono a tutt'oggi, a nostra conoscenza, solo due lavori (2, 6). Il primo risale al 1976 allorché Emerit riscontrava un'al-

ta frequenza di anomalie cromosomiche in 21 soggetti con fenomeno di Raynaud, 6 dei quali svilupparono una Sclerosi sistemica dopo cinque anni di follow-up. Il secondo lavoro, di Galeazzi del 1996, riportava i dati di uno studio condotto su una piccola casistica di pazienti affetti da fenomeno di Raynaud, in cui le alterazioni cromosomiche venivano riscontrate in modo statisticamente significativo nel gruppo di soggetti con positività di anticorpi antinucleo (fenomeno di Raynaud sospetto secondario). Entrambi i lavori, eseguiti con metodi di analisi classica di tipo citogenetico, come lo studio del cariotipo su colture di linfociti periferici, rilevavano sia fenomeni di aneuploidia che di rottura cromosomica.

Il fenomeno di Raynaud, che spesso precede anche di diversi anni la comparsa di una Sclerosi sistemica, è generalmente caratterizzato dalla presenza di auto-anticorpi sierici e alterazioni capillarosco-

*Lavoro premiato al XXXVIII Congresso SIR di Padova, 2001

Indirizzo per la corrispondenza:

Dott. Giovanni Porciello
Istituto di Reumatologia Policlinico Le Scotte
viale Bracci 53100 Siena
e-mail: g.porciello@katamail.com

piche periungueali, che lo contraddistinguono dal fenomeno di Raynaud idiopatico, in cui gli anticorpi sono assenti e la capillaroscopia è normale (7). Inoltre, un fR può essere verosimilmente considerato sospetto presclerodermico o sospetto secondario a una ScS, qualora presenti delle caratteristiche anticorpali (soprattutto anticorpi anti-centromero e anti-topoisomerasi-1) e capillaroscopiche (dilatazioni, megacapillari, aree avascolari) che sono tipiche della ScS e che quindi raramente si possono riscontrare in quei fR sospetti secondari ad altre malattie reumatiche, come l'artrite reumatoide, la polidermatomiosite, la sindrome di Sjogren, la connettivite mista, la crioglobulinemia mista etc (8-13).

I micronuclei sono piccoli nuclei accessori che si ritrovano nel citoplasma delle cellule che hanno subito un danno cromosomico, sia spontaneo che indotto: essi appaiono morfologicamente identici al nucleo principale ma di dimensioni ridotte e sono espressione sia di eventi di rottura (meccanismo clastogeno) che di perdita cromosomica (meccanismo aneuploidogeno) (14). Infatti, sia frammenti cromosomici privi del centromero, sia cromosomi interi in ritardo migratorio durante l'anafase, non riuscendo ad essere inglobati nei due nuclei di nuova formazione, sono in grado di formare micronuclei. Per identificare quale dei due meccanismi, clastogeno o aneuploidogeno, sia coinvolto nella formazione di micronuclei, si può usare l'analisi FISH (fluorescence in situ hybridization) con una sonda a DNA pancentromerico, che riconosce il centromero di tutti i cromosomi (15, 16); con questa tecnica, se la sonda riconosce nel micronucleo la presenza del centromero vuol dire che al suo interno si trova un intero cromosoma (meccanismo aneuploidogeno), in caso contrario vuol dire che nel micronucleo c'è soltanto un frammento di esso, espressione di rottura (meccanismo clastogeno). Sulla base delle suddette considerazioni abbiamo selezionato, da una casistica di 300 fR, 20 fR idiopatici e 20 fR sospetti presclerodermici. In questi soggetti e in 25 controlli sani abbiamo valutato la frequenza di danni cromosomici spontanei sui linfociti periferici, usando il test del micronucleo e l'analisi FISH con sonda a DNA pancentromerico. Scopo del nostro studio è pertanto quello di verificare la prevalenza di danni cromosomici nel gruppo dei fR presclerodermici confrontandola con quella riscontrabile nel fR idiopatico e nei controlli sani e stabilire secondariamente la presenza di un'eventuale correlazione tra danni cromosomici e profilo immunologico.

MATERIALI E METODI

Popolazione

Abbiamo valutato i danni cromosomici in 20 soggetti, tutte femmine, con fenomeno di Raynaud sospetto presclerodermico (età media 45 ± 5.2 anni, durata media fR 7 ± 7.5 anni), confrontandoli con 20 soggetti con fenomeno di Raynaud idiopatico (1 maschio e 19 femmine, età media 42 ± 5.4 anni, durata media fR 15 ± 8.7 anni) e 25 controlli sani (4 maschi e 21 femmine, età media 48 ± 6.7 anni).

I fR per essere considerati sospetti presclerodermici dovevano avere la positività dell'anticorpo anticentromero (ACA+) o dell'antitopoisomerasi 1 (Scl70+) e presentare alla capillaroscopia peringueale, eseguita con Videocap 200, una o più alterazioni tipiche della ScS quali dilatazioni, megacapillari o aree avascolari, in assenza però di lesioni cutanee o viscerali riferibili alla stessa ScS. Ovviamente i fR idiopatici e i controlli sani dovevano presentare la negatività degli anticorpi antinucleo e un quadro capillaroscopico normale e non dovevano operare con sostanze tossiche, come benzene, toluene, cloruro di vinile, etc. Nessuno dei soggetti con fR e dei soggetti sani assumeva o aveva assunto, nei 6 mesi precedenti lo studio, farmaci potenzialmente clastogeni; i soggetti che erano in trattamento farmacologico (11 fR presclerodermici e 13 fR idiopatici) assumevano farmaci non clastogeni, come vasodilatatori e reologici (bufloamedil, isradipina, amlodipina).

In tutti i soggetti dello studio veniva valutata la funzionalità renale con il dosaggio della creatinemia, dell'azotemia, dell'uricemia, degli elettroliti, della clearance della creatinina e dell'azoto.

La ricerca degli anticorpi antinucleo (ANA) veniva fatta con l'immunofluorescenza indiretta (IFI) su cellule HEp-2 (Immuno-Concepts, USA), mentre quella degli anti-ENA con la tecnica di immunodiffusione doppia, secondo Outcherlony. Dopo essere stato caratterizzato sotto il profilo anticorpale, ciascun soggetto veniva assegnato ad uno dei seguenti tre gruppi: ANA-, ACA+, Scl70+. Naturalmente solo i fR sospetti presclerodermici venivano sottoposti ad ulteriori indagini strumentali, come Rx torace, prove di funzionalità respiratoria (PFR) con diffusione alveolo-capillare del monossido di carbonio (DLCO), ECG, ecocolor Doppler cardiografia, ecografia renale, Rx esofago baritato e manometria esofagea.

Studio citogenetico

Le alterazioni citogenetiche sono state rilevate misurando la frequenza di cellule binucleate che presentavano micronuclei. Con l'intento di comprendere i meccanismi alla base dell'induzione dei micronuclei è stata realizzata un'analisi in fluorescenza, utilizzando una sonda specifica per tutti i centromeri dei cromosomi umani.

Test del micronucleo

I MN sono masserelle rotondeggianti di cromatina organizzate come piccoli nuclei accessori visibili nel citoplasma di cellule interfasiche che hanno compiuto un ciclo di divisione. Il trattamento delle colture con citocalasina B blocca la citodieresi delle cellule in mitosi garantendone un facile riconoscimento per il classico aspetto binucleato che esse assumono. Di ogni soggetto campionato venivano allestite due colture di sangue intero in terreno contenente fitoemoagglutinina ed incubate a 37°C per 72 ore. Alla 44ª ora veniva aggiunta la citocalasina B. Il recupero delle cellule veniva effettuato in accordo alla metodica classica (14). Per ogni individuo, la frequenza di MN era espressa come numero di cellule micronucleate (contenenti 1 o + MN) per 1000 linfociti binucleati su di un totale di 2000 cellule lette.

Analisi FISH

I vetrini contenenti i micronuclei venivano immersi per 2 minuti in una soluzione denaturante al 70% di formamide (pH 7.0), ad una temperatura di circa 72 °C, disidratati in una serie di etanoli freddi e lasciati asciugare all'aria. La sonda, marcata con digossigenina (Appligene Oncor), specifica per le sequenze centromeriche di tutti i cromosomi umani, veniva denaturata ad una temperatura di 72 °C per 5 minuti e distribuita sui vetrini, che venivano lasciati in incubazione a 37 °C all'interno di una camera umida per tutta la notte. Il giorno seguente, si lavavano i vetrini due volte a 37 °C per 4 minuti in una soluzione salina composta da sodio cloruro e sodio citrato (2x SSC). Per l'immunofluorescenza si effettuavano incubazioni sequenziali di 30 minuti ciascuna a 37 °C con anticorpi monoclonali anti-digossigenina (ibridi cellulari topo-topo, Boheringer Mannheim), anti-topo (sviluppati nel coniglio), coniugati con la tetrametilrodamina isotiocianato-TRITC, Sigma), ed anti-coniglio sempre coniugati con TRITC (Sigma). Gli anticorpi venivano ricostituiti in un tampone immunologico costituito dal 5% di non *fat dry milk* in 4x SSC. Al termine di ogni incubazione i vetrini ve-

nivano lavati per 2 minuti in una soluzione di 4x SSC/Tween 20. I vetrini venivano poi disidratati secondo le modalità già viste e lasciati ad asciugare. Poiché il fluorocromo TRITC dà una colorazione rossa, il DNA non marcato veniva controcolorato con il 4,6-diamidino-2-fenilindolo (DAPI), che sviluppa una fluorescenza blu.

L'ibridazione realizzata con l'utilizzo di questa sonda permette l'identificazione dei meccanismi alla base dell'induzione dei MN. La presenza in cellule binucleate di MN privi di segnale rosso (MN C-) indica che tali micronuclei sono formati da frammenti acentrici generati in seguito ad eventi di rottura cromosomica. Al contrario, MN centromero positivi (MN C+) sono formati da interi cromosomi, la cui presenza è il risultato di una malsegregazione cromosomica avvenuta durante l'anafase (15, 16).

Analisi statistica

Differenze nei livelli spontanei di MN tra fR sospetti presclerodermici, fR idiopatici e controlli sani sono state valute mediante analisi della varianza assumendo come significativi valori di $p < 0.05$.

RISULTATI

Valutazione clinica, strumentale e sierologica

Un attento esame obiettivo e gli esami strumentali eseguiti nei fR sospetti presclerodermici hanno escluso la presenza di qualsiasi alterazione cutanea (sclerosi, ulcere, teleangectasie, calcinosi, melanodermia, pseudovitiligo) o viscerale (polmonare, esofagea, cardiaca e renale), riferibile a ScS. La media del DLCO era dell'88% (predetto), mentre quella della pressione sistolica polmonare di 23 mmHg. La funzionalità renale è risultata nella norma in tutti i soggetti dello studio.

Le specificità anticorpali dei fR sospetti presclerodermici erano caratterizzate da 14 positività per ACA+ e 6 per Scl70+, mentre il quadro capillaroscopico mostrava la presenza di dilatazioni, diffuse micro-emorragie ed edema sub-papillare in 16 casi e megacapillari, riduzione di numero e ipertrofia delle papille in altri 4. Nessuno presentava aree avascolari ma la riduzione del numero dei capillari era molto evidente e presente soprattutto nei soggetti Scl70+.

Nessuno dei fR idiopatici e dei controlli sani presentava anticorpi antinucleo e/o alterazioni capillaroscopiche, per cui venivano classificati come ANA negativi (ANA-).

Tabella I - Risultati delle analisi di danno cromosomico (test del MN) nei linfociti periferici di soggetti con fR sospetto presclerodermico, fR idiopatico e controlli sani.

	N° di soggetti	Frequenza di MN (% media±D.S.
fR sospetti presclerodermici	20	39±15.2 ^a
fR idiopatici	20	10±2.1 ^b
controlli sani	25	9.8±3.5
fR ACA+	14	44±8.1 ^c
fR Scl70+	6	26±7.1 ^d
fR ANA-	20	10±2.1

^aSignificativamente differente dai controlli e dai fR idiopatici (p<0.0001).
^bStatisticamente non differente dai controlli (p=ns).
^cSignificativamente differente dai fR Scl70+(p=0.0002) e dai fR ANA- (p<0.0001)
^dSignificativamente differente rispetto ai fR ANA- (p<0.0001)

ACA+: anticorpo anticentromero. Scl70+: anticorpo anti-topoisomerasi 1.
 ANA-: assenza di anticorpi anti-nucleo.

Analisi citogenetica

La tabella I riporta i risultati dell'analisi citogenetica eseguita sui linfociti periferici dei fR sospetti presclerodermici, dei fR idiopatici e dei controlli sani. La frequenza media di cellule micronucleate rilevata nel gruppo dei fR sospetti presclerodermici è statisticamente più alta rispetto ai fR idiopatici e ai controlli sani (39±15.2 vs 10±2.1 e 9.8±3.5 rispettivamente, p<0.0001). È molto interessante notare che i fR idiopatici hanno una frequenza di micronuclei sovrapponibile ai controlli sani.

In fondo alla tabella sono riportati inoltre i valori dei livelli basali di danni cromosomici classificati sulla base del profilo immunologico ACA+, Scl70+ ANA-. I fR ACA+ mostrano una frequenza di micronuclei spontanei di 44±8.1, significativamente più elevata rispetto a quella dei fR Scl70+ (26±7.1, p=0.0002), che a loro volta presentano una frequenza di micronuclei significativamente più elevata dei fR ANA- e di conseguenza anche dei controlli sani (p<0.0001).

Tabella II - Risultati dell'analisi FISH nei soggetti ACA+ e Scl70+.

	N° di soggetti media±SD	Frequenza di MN C+ (%)
ACA+	14	74.7±11.4 ^a
Scl70+	6	71.8±10.6

^aStatisticamente non significativo rispetto ai soggetti Scl70+ (p= ns).
 ACA+: anticorpi anti-centromero; Scl70+: anticorpi anti-topoisomerasi 1;
 MN C+: presenza del centromero all'interno del micronucleo.

La tabella II riporta infine il risultato dell'analisi FISH e indica che non c'è differenza nella percentuale di micronuclei contenenti il segnale per il centromero (C+MN) tra i soggetti ACA+ e Scl70+.

DISCUSSIONE

Il presente lavoro riporta i risultati dell'analisi di danno cromosomico eseguita su linfociti coltivati di sangue periferico di un gruppo di 20 fR sospetti presclerodermici, 20 fR idiopatici e 25 controlli sani. Il livello di alterazioni cromosomiche, espresso come frequenza di cellule micronucleate, è risultato significativamente più elevato nei fR sospetti presclerodermici e l'analisi dei dati in funzione del profilo immunologico ha rilevato che, sebbene la casistica sia ancora limitata, i livelli spontanei più alti di micronuclei caratterizzano i soggetti ACA+. Possiamo escludere in questo studio che i danni cromosomici siano stati "indotti" da sostanze farmacologiche e/o tossiche, in quanto nessuno dei soggetti aveva assunto farmaci potenzialmente clastogeni o adoperato sostanze tossiche.

Molti studi condotti sia con metodi di analisi classica di tipo citogenetica, come lo studio del cariotipo, (1-4) sia con metodi più moderni che fanno uso del test del micronucleo e di sonde specifiche a DNA o microsatelliti (17, 26) confermano l'esistenza di anomalie cromosomiche nella ScS e nel fR. È interessante notare che nello studio della Emerit 6 fR con evidenti danni cromosomici svilupparono una ScS dopo 5 anni di follow-up e che, non essendo stati essi in precedenza classificati sotto il profilo immunologico e capillaroscopico, la loro natura presclerodermica era, in quel caso, probabilmente segnalata solo dall'alta frequenza di anomalie cromosomiche. D'altronde anche nel lavoro di Galeazzi le anomalie cromosomiche venivano riscontrate in modo statisticamente significativo solo nei fR ANA+, anche se in questo studio non era stata eseguita la capillaroscopia, per cui i fR non potevano essere considerati, in senso stretto, sospetti presclerodermici e non sappiamo quindi, in assenza di un adeguato follow-up, se la maggior frequenza di danni cromosomici si riscontrava soprattutto in quei fR a maggior rischio di sviluppo di una ScS. L'importanza di ricercare i danni cromosomici nei fR sospetti presclerodermici risiede nel fatto che essi sono presenti nella ScS più che in altre connettiviti (17). Esistono infatti evidenze che permettono di correlare tali anomalie con la presenza nel siero dei pazienti con ScS di un fattore cla-

stogeno circolante inferiore ai 10.000 daltons (18). Tale fattore sarebbe prodotto a seguito di un'aumentata produzione di radicali liberi per un aumento dei processi ossidativi più tipico della ScS che di altre malattie sistemiche del connettivo. L'aumento dei processi ossidativi è stato recentemente confermato (19, 20) tramite la dimostrazione che nei pazienti sclerodermici esiste un aumento di anticorpi circolanti diretti contro lipoproteine ossidate a bassa densità e che il burst respiratorio è alterato soprattutto nei pazienti con ScS di recente insorgenza, o comunque, con uno stadio iniziale di malattia. Relativamente al ruolo svolto da certi auto-anticorpi specifici di alcune forme di ScS, quali gli anti-centromero, nel determinare la comparsa di alterazioni cromosomiche, il dibattito è ancora aperto (17, 21, 22, 26). Non è chiaro se essi siano in grado, da soli, di determinare tali alterazioni ovvero se gli autoanticorpi rappresentino soltanto l'epifenomeno di un danno cromosomico già verificatosi a seguito dell'aumento dello stress ossidativo. Jabs et al. (21) hanno osservato incrementi significativi delle frequenze di aneuploidia in colture di linfociti di pazienti sclerodermici che presentavano anticorpi contro il centromero, mentre pazienti con anticorpi anti-topoisomerasi I mostravano una prevalenza di anomalie cromosomiche dovute ad eventi clastogeni (17). Al contrario, altri Autori non hanno trovato differenze significative tra pazienti ACA+ e ACA- nei livelli spontanei di anomalie cromosomiche strutturali e numeriche (22). A questo proposito, l'inattivazione del centromero o l'alterazione dell'attività della topoisomerasi I, enzima coinvolto nelle fasi iniziali della replicazione e riparazione del DNA, da parte delle due classi di anticorpi, potrebbero infatti causare, rispettivamente, una non corretta migrazione dei cromosomi (evento aneuploidogeno) o la formazione di rotture nell'elica del DNA (evento clastogeno). Nel nostro studio attualmente non è possibile spiegare per quale ragione le alterazioni cromosomiche risultino più frequenti nel fR sospetto presclerodermico, rispetto a quello idiopatico, anche se è ragionevole pensare che un fR, caratterizzato dalla presenza di anticorpi anticentromero o antitopoisomerasi I e specifiche alterazioni capillaroscopiche, possa essere soggetto agli stessi eventi clastogeni e/o aneuploidogeni (specie radicali dell'ossigeno, TNF α , citochine, anticorpi) tipiche della ScS, ancor prima di una sua possibile comparsa (23-25). È probabile quindi che, come nella ScS, diversi fattori contribuiscano alla comparsa di danni cromosomici nel fR sospetto presclerodermico, come la

presenza dell'anticorpo anticentromero, che potrebbe essere responsabile dei fenomeni di aneuploidia o dell'antitopoisomerasi I e dello stress ossidativo, che invece potrebbero essere responsabili dei fenomeni clastogeni. Alla luce di queste considerazioni, abbiamo effettuato un'analisi in fluorescenza dei MN nei fR sospetti presclerodermici, usando una sonda specifica per il centromero di tutti i cromosomi. In questo modo abbiamo visto che entrambi gli eventi clastogeni e aneuploidogeni sono responsabili della formazione dei micronuclei, suggerendo che verosimilmente gli anticorpi anticentromero e antitopoisomerasi I interagiscono con altri fattori, probabilmente lo stress ossidativo, nel determinare l'anomalia citogenetica. In conclusione il presente studio conferma la presenza di elevati livelli di anomalie cromosomiche nei linfociti periferici di soggetti con fR sospetto presclerodermico, soprattutto con specificità anticorpale ACA+. L'analisi FISH indica che nei micronuclei si trovano interi cromosomi o frammenti di essi in uguale misura sia nei soggetti ACA+ che Sc170+, suggerendo che entrambi gli eventi clastogeni ed aneuploidogeni sono responsabili del danno cromosomico.

Infine se i dati fossero confermati da altri studi e da un follow-up a 5 anni dei fR sospetti presclerodermici, si potrebbe ipotizzare un ruolo diagnostico e predittivo del test del micronucleo nei fR. Tale test potrebbe essere aggiunto ad altri già utilizzati a questo scopo, quali la ricerca appunto degli autoanticorpi specifici e l'esame capillaroscopico.

BIBLIOGRAFIA

1. Pan SF, Rodnan GP, Deutsch M, Wald N. Chromosomal abnormalities in progressive Systemic sclerosis (Scleroderma) with consideration of radiation effects. *J Lab Clin Med* 1975; 86.
2. Emerit I. Chromosomal breakage in Systemic sclerosis and related disorders. *Dermatologica* 1976;153: 145-56.
3. Emerit I, Marteau R. Chromosome studies in 14 patients with Disseminated Sclerosis. *Humangenetik* 1971; 13: 25-33.
4. Wolff DJ, Needleman BW, Wasserman SS, Schwartz S. Spontaneous and clastogen induced chromosomal breakage in Scleroderma. *J Rheumatol* 1991; 18: 837-40.
5. Sherer GK, Jackson BB, Leroy EC. Chromosome breakage and sister chromatid exchange frequencies in Scleroderma. *Arthritis Rheum* 1981; 24: 1409-13.
6. Galeazzi M, Anichini C, Morozzi G, Bellisai F, Puddu P, Marcolongo R. Chromosomal abnormalities in peripheral lymphocytes from idiopathic Raynaud's phenomenon patients. *Clin Rheum* 1996; 15: 418-9.

RIASSUNTO

Scopo dello studio: Verificare la presenza di danni cromosomici nei linfociti periferici di 20 soggetti con fenomeno di Raynaud (fR) sospetto presclerodermico, confrontandoli con 20 fR idiopatici e 25 controlli sani.

Metodi: I danni cromosomici sono stati valutati con il test del micronucleo (MN) e l'analisi FISH con sonda a DNA pancentromerico.

Risultati e conclusioni: I fR sospetti presclerodermici mostrano una frequenza di MN significativamente maggiore rispetto ai fR idiopatici e ai controlli sani. L'analisi dei dati in funzione dello stato anticorpale indica che le frequenze maggiori di MN caratterizzano i soggetti ACA+. L'analisi FISH suggerisce che entrambi gli eventi clastogeni ed aneuploidogeni sono responsabili della formazione dei micronuclei nei fR sospetti presclerodermici.

Parole chiave - Sclerosi Sistemica, fenomeno di Raynaud, fattori clastogeni, danni cromosomici, micronuclei nei linfociti umani.

Key words - *Systemic sclerosis, Raynaud's phenomenon, chromosomal breakage, micronucleus assay.*

7. LeRoy EC, Medsger TA Jr. Raynaud's phenomenon: a proposal for classification. *Clin Exp Rheumatol* 1992; 10: 458-8.
8. Zufferey P, Depairon M, Chamot AM, Monti M. Prognostic significance of nailfold capillary microscopy in patients with Raynaud's phenomenon and scleroderma-pattern abnormalities. A six-year follow-up study. *Clin Rheumatol* 1992; 11: 536-41
9. Sarkozi J, Bookman AA, Lee P, Keystone EC, Fritzler MJ. Signification of anticentromere antibody in idiopathic Raynaud's syndrome. *Am J Med* 1987; 83: 893-8.
10. Tramposch HD, Smith CD, Senecal JL, Rothfield N. A long-term longitudinal study of anticentromere antibodies. *Arthritis Rheum* 1984; 27: 121-4.
11. Kallenberg CG, Pastoor GW, Wouda AA, The TH. Antinuclear antibodies in patients with Raynaud's phenomenon: Clinical significance of anticentromere antibodies. *Ann Rheum Dis* 1982; 41: 382-7.
12. Maricq HR, Harper FE, Khan MM, Tan EM, LeRoy EC. Microvascular abnormalities as possible predictors of disease subsets in Raynaud's phenomenon and early connective tissue disease. *Clin Exp Rheumatol* 1983; 1: 195-205.
13. Kallenberg CG. Early detection of connective tissue disease in patients with Raynaud's phenomenon. *Reum Dis Clin North Am* 1990; 16:11-30.
14. Fenech M. The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application too genotoxicity studies in human population. *Mutat Res* 1993; 285: 35-44.
15. Migliore L, Scarpato R, Falco P. The use of fluorescence in situ hybridization with a B-satellite DNA probe for the detection of acrocentric chromosomes in vanadium-induced micronuclei. *Cytogenet Cell Genet* 1995; 69: 215-19.
16. Scarpato R, Landini E, Migliore L. Acrocentric chromosome frequency in spontaneous human lymphocyte micronuclei, evaluated by dual-colour hybridisation, is neither sex-nor age-related. *Mutat Res* 1996; 372: 195-204.
17. Migliore L, Bevilacqua C, Scarpato R. Cytogenetic study and FISH analysis in lymphocytes of systemic Lupus erythematosus (SLE) and systemic sclerosis (SS) patients. *Mutagenesis* 1999;14: 227-31.
18. Emerit I, Philipe P, Meunier P, Auclair C, Freitas J, Deroussent A et al. Clastogenic activity in the plasma of scleroderma patients: a biomarker of oxidative stress. *Dermatology* 1997; 194: 140-6.
19. Simonini G, Cerinic MM, Generini S, Zoppi M, Anichini M, Cesaretti C. Oxidative stress in Systemic sclerosis. *Mol Cell Biochem* 1999; 196 :85-91.
20. Herrick AL, Maticci Cerinic M. The emerging problem of oxidative stress and the role of ant-oxidants in systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol* 2001; 19: 4-8.
21. Jabs EW, Tuck-Muller CM, Anhalt GJ, Earnshaw W, Wise RA, Wigley F. Cytogenetic survey in Systemic sclerosis: correlation of aneuploidy with the presence of anticentromere antibodies. *Cytogenet Cell Genet* 1993; 63: 169-75.
22. Powell FC, Schroeter AL, Winkelmann RK, Dewald GW. Chromosome studies in Scleroderma with Consideration of anticentromere antibody status and assessment of possible in vitro clastogenic activity. *Acta Derm Venereol* 1986; 66: 414-18.
23. Bruckdorfer KR, Hillary JB, Bunce T, Vancheeswaran R, Black CM. Increased susceptibility to oxidation of low-density lipoproteins isolated from patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 1995; 38: 1060-7.
24. Blann AD, Illingworth K, Jayson MI. Mechanism of endothelial cell damage in systemic sclerosis and Raynaud's phenomenon. *J Rheumatol* 1993; 20: 1325-30.
25. Generini S, Kahaleh B, Maticci-Cerinic M, Pignone A, Lombardi A, Ohtsuka T. Raynaud's phenomenon and systemic sclerosis. *Ann Ital Med Int* 1996; 11: 125-31.
26. Porciello G, Scarpato R, Storino F, Cagetti F, Marcolongo R, Migliore L, et al. The high frequency of spontaneous micronuclei observed in lymphocytes of systemic sclerosis patients: preliminary results. *Reumatismo* 2002; 54: 36-9.