

## **RIASSUNTO**

Il lupus eritematoso sistemico (LES) è una malattia autoimmune in grado di coinvolgere qualsiasi organo od apparato del corpo umano. La glomerulonefrite (GN) lupica è la complicanza più severa e frequente del LES ed è un indice di gravità di malattia. I pazienti con malattia grave hanno una prognosi a lungo termine meno favorevole rispetto a quella dei pazienti con malattia lieve.

Nel trattamento della GN lupica vengono solitamente impiegati protocolli terapeutici basati sull'utilizzo di farmaci immunosoppressori come ciclofosfamide, azatioprina e ciclosporina A, dotati di tossicità a breve, medio e lungo termine che ne controindica la somministrazione in una percentuale non trascurabile di pazienti. Questa tossicità può in alcuni casi pregiudicare la sopravvivenza a lungo termine dei pazienti con GN lupica. Per questi motivi, negli ultimi anni è emersa l'esigenza di protocolli terapeutici alternativi con minori effetti tossici o da impiegare nei pazienti non responsivi od intolleranti al trattamento con i farmaci tradizionali.

In questi anni è entrata in commercio una nuova molecola, il Micofenolato Mofetile (MMF), immunosoppressore utilizzato con successo nella prevenzione del rigetto del trapianto di vari organi, come trattamento per alcune malattie reumatiche sistemiche, tra cui il LES ed in particolare la GN lupica.

Il nostro studio prospettico, osservazionale, è stato condotto su un campione di 70 pazienti affetti da GN lupica seguiti per un *follow-up* medio di 54 mesi. I pazienti afferivano a tre centri del Nord Italia: Padova, Milano e Brescia. Tutti e tre i Centri hanno utilizzato lo stesso protocollo terapeutico sia per la terapia di induzione della remissione che per la terapia di mantenimento. Lo scopo è stato quello di valutare l'efficacia e la tollerabilità del MMF nella terapia di mantenimento

della remissione della GN lupica. Quaranta hanno assunto MMF e 30 una terapia con azatioprina o ciclosporina A definita come trattamento *standard*. Al termine del *follow up*, il MMF è risultato efficace come il trattamento *standard* nella terapia di mantenimento della GN e meglio tollerato.

È stato pertanto possibile concludere che il MMF è una valida alternativa terapeutica, efficace e sicura, rispetto ai farmaci tradizionalmente utilizzati nel mantenimento della remissione della glomerulonefrite lupica.

## **SUMMARY**

Systemic lupus erithematosus (LES) is an autoimmune disease that can potentially involve any organ or system of the human body. Glomerulonephritis (GN) has been recognized as the most frequent severe manifestation of LES leading to poor long term prognosis. In the treatment of lupus GN, several therapeutic approaches, all including immunosuppressive drugs such as cyclophosphamide, azathioprine (AZA), or cyclosporine A (CYA) have been used. The short and long term toxicity of these drugs limits their use in a substantial number of patients. Mycophenolate mofetil (MMF) is an immunosuppressant which provides protection against transplant rejection. MMF has been more recently used in many autoimmune inflammatory conditions, including SLE. Over the last few years MMF has emerged as an alternative regimen mainly for patients with SLE manifestations refractory to other therapies. Since January 1999 we have treated 70 SLE patient with diffuse proliferative GN followed-up from three Northern Italian Rheumatological Centres: Padova, Brescia and Milano. In this 54-month, observational, prospective study 40 were treated with MMF and compared with 30 treated with standard therapy: AZA or CYA. This study has shown that MMF is highly effective and generally well tolerated.

## INTRODUZIONE

La prognosi *quoad vitam* del lupus eritematoso sistemico è nettamente migliorata in questi ultimi anni. Un recente studio eseguito presso il nostro centro ha mostrato una sopravvivenza a 5, 10, 15 anni dalla diagnosi rispettivamente del 96%, 93% e 76% (1). Tuttavia la curva di sopravvivenza dei pazienti con manifestazioni severe di malattia, che nei primi quindici anni coincideva con l'andamento di quella descritta per i pazienti con malattia lieve, dopo tale periodo divergeva mostrando un rapido declino nei pazienti con malattia grave (1).

Sono considerate manifestazioni gravi della malattia: la GN, l'interessamento del sistema nervoso centrale, polmonare o cardiaco e l'anemia sia essa emolitica o aplastica. Queste manifestazioni richiedono terapie più intense e solitamente necessitano di alte dosi di corticosteroidi e di farmaci immunosoppressori (2).

L'interessamento renale è la manifestazione di coinvolgimento d'organo di più frequente riscontro nei pazienti affetti da LES. I quadri clinico-patologici di nefropatia lupica sono assai variabili per tipo e gravità, ma in genere l'impegno renale determina una situazione clinica grave, prognosi severa e necessità di terapia aggressiva (3).

Secondo la nostra esperienza a livello clinico circa la metà dei pazienti presenta segni di impegno renale. Vi è un'ampia variabilità della frequenza che dipende dal campione di pazienti considerato e soprattutto dal tipo di struttura che raccoglie la casistica. E' inevitabile infatti che una casistica proveniente dai centri di nefrologia avrà una frequenza di GN sensibilmente più elevata rispetto ad una casistica di un centro reumatologico o internistico.

## **PATOGENESI DELLA GLOMERULONEFRITE LUPICA**

Nella patogenesi della GN lupica intervengono diversi meccanismi indipendenti tra loro ai quali possono essere ricondotte le differenti lesioni fenotipiche ed istopatologiche che caratterizzano l'interessamento renale:

### **Ruolo degli autoanticorpi**

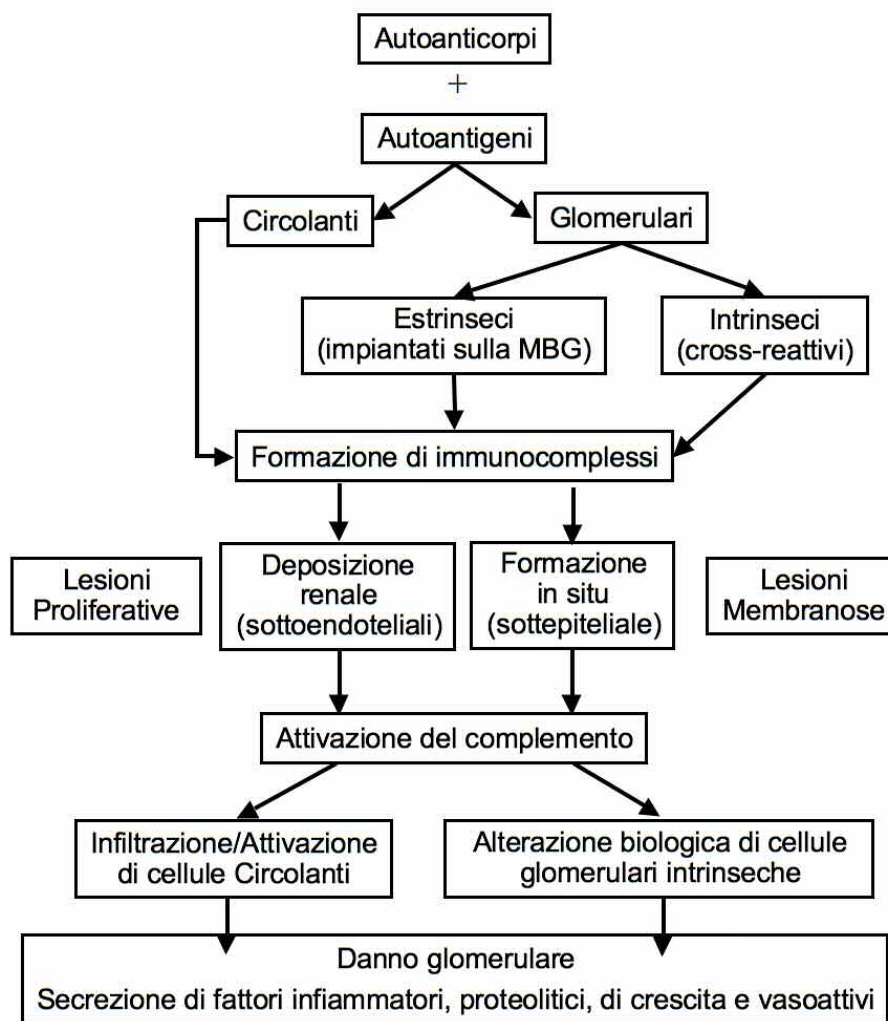
Il principale meccanismo immunologico sembra essere un'alterata regolazione della risposta immune, cui consegue la produzione abnorme di autoanticorpi diretti contro numerosi antigeni *self* (4). Attualmente si ritiene che la produzione di anticorpi sia un processo T-dipendente e non derivi da una semplice attivazione policlonale dei linfociti B come inizialmente ipotizzato. L'interazione tra linfociti T e B è mediata da molecole di superficie quali: B7-CD28/CTLA4 e CD40-CD40L. La teoria che ipotizza l'esposizione di antigeni intracellulari a livello della membrana citoplasmatica accredita al processo apoptotico un ruolo determinante (5); infatti durante il processo di morte programmata alcuni antigeni normalmente localizzati all'interno cellula vengono modificati dalle caspasi, resi immunogeni, e successivamente esposti sulla superficie delle cellule (6,7). Oltre ad una aumentata apoptosi nei pazienti affetti da LES vi è un aumentato numero di cellule apoptotiche circolanti a causa del deficit di *clearance* (8,9).

### **Ruolo degli IC**

La deposizione di IC nei tessuti e la successiva attivazione della risposta infiammatoria sono dovute ad un aumento della loro produzione e ad una diminuzione del loro catabolismo a livello del sistema reticoloendoteliale (10). Gli IC possono formarsi per interazione diretta con autoantigeni circolanti sequestrati all'interno

del glomerulo (ad esempio istoni/DNA/nucleosomi), cross-reattività con antigeni del glomerulo (ad esempio: eparansolfato, laminina) ed infine deposito di IC circolanti a livello renale.

Dal meccanismo con cui si formano gli IC e dalla loro sede di deposizione dipendono i vari quadri istologici (11,12); è stato dimostrato in modelli animali sperimentali che se gli IC circolanti si depositano in sede sottoendoteliale determinano lo sviluppo di lesioni di tipo proliferativo, mentre se si formano *in situ* e si depositano in sede sottoepiteliale sono responsabili delle lesioni membranose (Figura 1).



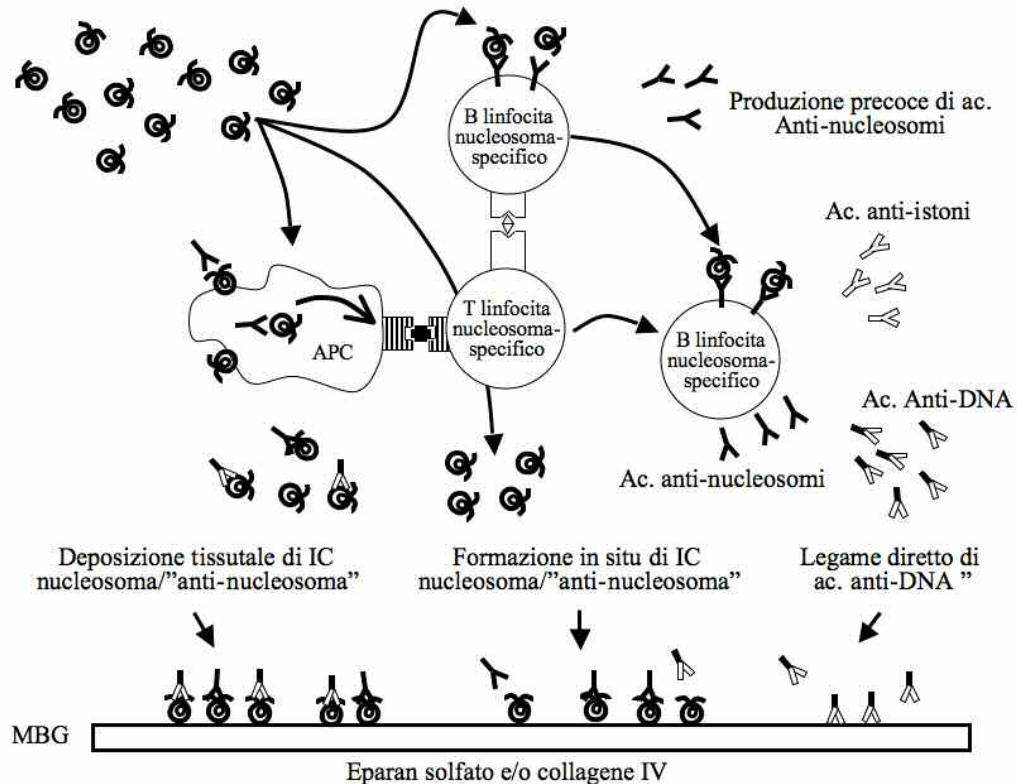
**Figura 1.** Schema sul ruolo degli IC nella patogenesi della glomerulonefrite.

Con la deposizione degli IC circolanti a livello glomerulare, si attivano il sistema del complemento e la produzione di fattori chemiotattici per i leucociti ed altre cellule immunitarie. Gli ultimi sono responsabili di ipercellularità e necrosi, nonché della formazione del complesso di attacco alla membrana, C5b-9, a sua volta responsabile dell'aumento della permeabilità glomerulare. Recentemente è stato dimostrato che la deposizione di immunocomplessi non è sufficiente per lo sviluppo del danno renale, ma sembra particolarmente importante l'espressione genica del recettore Fc $\gamma$  delle immunoglobuline. Effettivamente i topi *knockout* per tale recettore non sviluppano la GN nonostante l'abbondante deposizione di IC e complemento a livello glomerulare, dimostrando come la lesione dipenda dall'espressione del recettore Fc $\gamma$  più che dalla deposizione di IC.

### **Ruolo degli anticorpi antinucleosomi**

I nucleosomi sono l'unità fondamentale della cromatina e derivano dall'associazione del DNA con gli istoni. Ogni unità è composta da otto molecole di istoni che formano un nucleo proteico centrale attorno al quale si avvolge per due volte un doppio filamento di DNA, ciascun nucleosoma è riunito all'altro grazie ad una porzione di DNA detto riunente. Il complesso è altamente immunogenico e gli anticorpi antinucleosomi compaiono precocemente, prima dello sviluppo degli anticorpi anti-DNA e degli anti-istoni (13,14). Gli istoni hanno carica positiva ed è per questo motivo che i complessi nucleosomi-autoanticorpi diretti contro il DNA si legano all'eparansolfato, costituente della membrana basale glomerulare, che presenta carica negativa (15-19). I complessi formati da nucleosomi ed anticorpi anti-DNA sembrano, inoltre, avere una maggiore affinità per la membrana basale del glomerulo rispetto a

quelli complessati con anticorpi anti-istoni. Questo perché i primi anticorpi, schermando la carica negativa del DNA, aumentano l'affinità degli IC per l'eparansolfato (20,21) (Figura 2).



**Figura 2.** Ruolo degli anticorpi antinucleosomi nella patogenesi della glomerulonefrite.

### **Penetrazione degli anticorpi anti-DNA all'interno delle cellule mesangiali *in vivo*.**

Gli anticorpi anti-DNA attraversano sia la membrana citoplasmatica sia quella nucleare grazie ad una proteina chiamata *Myosin I* di 101 KDa (22-24). All'interno della cellula l'anti-DNA interferisce con l'attività dell'enzima DNAasi I, che sembra svolgere un ruolo importante nell'apoptosi, per altro già accentuata nei processi flogistici (25-29): tale interferenza potrebbe avere degli effetti dannosi



e spiegare lo sviluppo dell'ipercellularità tipica della flogosi glomerulare (11).

## **LA BIOPSIA RENALE**

La biopsia renale ecoguidata è un'indagine basilare nella pratica clinica (30,31). Non essendovi un'esatta corrispondenza tra le manifestazioni cliniche e le lesioni istologiche la biopsia renale diviene un'indagine necessaria per una corretta definizione dell'impegno renale. Nei primi studi condotti sulla GN lupica e riportati in letteratura, in cui si consideravano pazienti non trattati o trattati in modo insufficiente, la GN proliferativa diffusa era la classe istologica che si associava a prognosi peggiore. Negli studi più recenti in cui si considerano pazienti trattati con protocolli terapeutici più aggressivi, la prognosi della GN proliferativa diffusa è decisamente migliorata. Tale considerazione si può estendere a tutte le lesioni che siano espressione di attività della GN. Esse possono infatti essere modificate da una terapia aggressiva mentre le lesioni di tipo cronico, poiché imm modificabili, risultano sempre indice di cattiva prognosi, in tali casi non è quindi giustificato un trattamento aggressivo.

La conoscenza del quadro istologico risulta dunque indispensabile per sottoporre i pazienti ad un regime terapeutico adeguato alle caratteristiche della loro GN.

L'indicazione alla biopsia renale viene posta qualora compaiano: proteinuria delle 24 ore  $>0,5-1\text{g}/\text{die}$ , ematuria di dubbia origine in particolare se gli eritrociti si presentano dismorfici, e presenza o meno di cilindri cellulari (32).

Attualmente la biopsia renale è considerata una procedura piuttosto sicura. Le sue principali complicanze risultano essere:

- Ematuria macroscopica in una percentuale di casi inferiore al 10%;
- Fistola arterovenosa: con frequenza inferiore a 1%;
- Emorragia grave tale da richiedere l'intervento in meno di un paziente su 100;
- Decesso nello 0,1% dei casi.

## **QUADRI ISTOLOGICI ED ASPETTI CLINICI**

Il glomerulo è il bersaglio principale della malattia, anche se è stato dimostrato che tutti i tratti del nefrone possono essere interessati. L'analisi del campione bioptico al microscopio ottico (MO), elettronico (ME) e con IF permette di individuare sei classi immunoistologiche (33-35). La classificazione della nefrite lupica è stata recentemente rivista dalla Società Internazionale di Nefrologia e di Patologia Renale (ISN/RPS) (36). Nella nuova classificazione sono stati introdotti alcuni parametri che mancano nella classificazione dell'OMS tra cui il giudizio sull'attività e cronicità/inattività delle lesioni istologiche riportato in Tabella I.

### **Classe I: GN mesangiale a lesioni minime.**

Comprende i casi nei quali il MO non mostra reperti patologici, ma l'IF mostra depositi immunitari a livello mesangiale (36).

Aspetti clinici: non ci sono segni di nefropatia.

### **Classe II: GN proliferativa mesangiale.**

Al MO sono visibili ipercellularità o espansione della matrice mesangiale, con depositi immunitari a livello del mesangio. All'IF o al ME possono essere visibili minimi depositi immunitari a livello subendoteliale o subepiteliale, non visibili al MO (36).

Aspetti clinici: nonostante la GN proliferativa mesangiale possa essere presente già all'esordio in tutti i casi di LES, possono mancare segni

clinici e urinari, salvo in alcuni pazienti che mostrano lieve ematuria e/o proteinuria. I segni urinari possono scomparire, ma il quadro può anche evolvere verso altre forme di GN.

### **Classe III: GN proliferativa focale**

È una glomerulonefrite proliferativa a distribuzione focale (coinvolge meno del 50% dei glomeruli), segmentaria (III-S cioè è coinvolto meno del 50% della superficie del glomerulo) o globale (III-G cioè quando i glomeruli sono coinvolti in oltre il 50% della loro superficie), tipicamente con depositi subendoteliali, con o senza alterazioni mesangiali.

Si suddivide anche in altre tre sottoclassi: III (A): glomerulonefrite proliferativa focale con solo lesioni attive; III (A/C): glomerulonefrite proliferativa focale e sclerosante con lesioni attive e croniche/inattive; III (C): glomerulonefrite sclerosante focale con solo lesioni croniche/inattive.

Aspetti clinici: vi sono sempre segni urinari e clinici, la proteinuria e l'ematuria sono sempre presenti. La sindrome nefrosica è rara e l'insufficienza renale se presente è lieve, a meno che non vi sia un'evoluzione verso la forma diffusa. Si può avere remissione, riacutizzazione o evoluzione verso un'altra classe di GN.

### **Classe IV: GN proliferativa diffusa**

Nella nostra casistica è la classe istologica di più frequente riscontro, su una casistica di 70 biopsie renali, raccolte dal 1990 al 2000 la GN proliferativa diffusa è stata riscontrata in oltre il 70% dei pezzi istologici (32).

È caratterizzata dallo stesso tipo di lesioni della classe precedente, ma con una diffusione più ampia (più del 50% dei glomeruli) con depositi immunitari subendoteliali diffusi, con o senza alterazioni mesangiali.

E' suddivisa in due sottoclassi: IV-S, o glomerulonefrite diffusa e segmentale, quando >50% dei glomeruli hanno lesioni segmentali e IV-G o glomerulonefrite diffusa e globale, quando >50% dei glomeruli sono coinvolti per oltre il 50% della loro superficie.

A seconda della presenza di solo lesioni attive o croniche/inattive (Tabella I) o della coesistenza delle lesioni attive e inattive le due sottoclassi possono essere poi ulteriormente suddivise in classe IV-S (A) o glomerulonefrite proliferativa diffusa segmentale con lesioni attive; classe IV-G (A) o glomerulonefrite diffusa globale con lesioni attive; classe IV-S (A/C) o glomerulonefrite proliferativa diffusa segmentale con lesioni attive e croniche; classe IV-G (A/C) o glomerulonefrite proliferativa diffusa globale con lesioni attive e croniche; classe IV-S (C) o glomerulonefrite proliferativa diffusa segmentale con lesioni croniche ed infine classe IV-G (C) o glomerulonefrite proliferativa diffusa globale con lesioni croniche (36).

Aspetti clinici: il quadro è generalmente grave, con proteinuria ed ematuria, sindrome nefritica, sindrome nefrosica, insufficienza renale e ipertensione arteriosa. Vi può essere remissione ma anche progressione verso l'uremia conclamata.

#### **Classe V: GN membranosa**

Caratterizzata da depositi immunitari subepiteliali al MO, ME e IF a distribuzione segmentale o globale. Può presentarsi in associazione alla classe III e/o IV e associarsi a lesioni sclerotiche.

Aspetti clinici: presenta costante proteinuria, spesso associata a ematuria ed a sindrome nefrosica (32). Vi può essere lieve insufficienza renale. La sindrome nefrosica può migliorare, ma presentare poi ricadute. Col passare del tempo si possono instaurare ipertensione ed insufficienza renale a lenta evoluzione.

### **Classe VI: scleroialina**

Caratterizzata da oltre il 90% di glomeruli scleroialini, può associarsi ad atrofia tubulare e fibrosi interstiziale.

Aspetti clinici: i pazienti hanno insufficienza renale, ipertensione e proteinuria. Si tratta di un quadro ormai irreversibile che è destinato a evolvere verso l'insufficienza renale terminale.

### **Lesioni miste e trasformazioni**

Il cambiamento da una classe ad un'altra può essere indotto dalla terapia o presentarsi spontaneamente. Nei pazienti che rispondono al trattamento si può verificare il passaggio da una classe maggiore IV o V ad una inferiore, solitamente la II (37-42). La mancanza di studi bioptici su pazienti non trattati non permette di trarre conclusioni sul passaggio spontaneo o sull'evoluzione delle lesioni in pazienti che non seguono un regime terapeutico.

### **Altre caratteristiche patologiche**

Le lesioni tubulo-interstiziali e vascolari rappresentano una componente importante delle alterazioni renali e possono contribuire allo sviluppo del quadro clinico. Tra le seconde si annoverano arterio- ed arteriolo-sclerosi, trombosi intravascolare e vasculite necrotizzante (43-48). La nefrite tubulointerstiziale attiva e severa si osserva con maggior frequenza nei pazienti con lesioni glomerulari di classe III o IV e si presenta con infiammazione interstiziale, fibrosi ed alterazioni dell'epitelio tubulare (49).

## LESIONI GLOMERULARI ATTIVE E INATTIVE/CRONICHE

<b><u>Lesioni glomerulari attive</u></b>
<ul style="list-style-type: none"><li>➤ Ipercellularità endocapillare con o senza infiltrazione di leucociti e con riduzione sostanziale del lume capillare</li><li>➤ Carioressi</li><li>➤ Necrosi fibrinoide</li><li>➤ Rottura della membrana basale glomerulare</li><li>➤ Semilune cellulari e fibrocellulari</li><li>➤ Depositi subendoteliali identificabili al MO (wireloops)</li><li>➤ Aggregati di materiale immunologico intraluminari (trombi ialini)</li></ul>
<b><u>Lesioni inattive/croniche</u></b>
<ul style="list-style-type: none"><li>➤ Sclerosi glomerulare (segmentale/globale)</li><li>➤ Aderenze fibrose</li><li>➤ Semilune fibrose</li></ul>

**Tabella I.** Lesioni glomerulari attive ed inattive/croniche in corso di LES.

## **TRATTAMENTO DELLA GN LUPICA**

La comparsa di GN lupica in un paziente con LES comporta, generalmente, lo sviluppo di un quadro clinico grave che peggiora la prognosi a lungo termine della malattia (1,50-53). Per questo motivo è importante mettere in atto un trattamento aggressivo e tempestivo. La maggior parte degli Autori concorda nel ritenere che la terapia della GN lupica debba basarsi sulla classe e sull'attività istologica della stessa (54,55). Le lesioni attive sono quelle che hanno maggiori possibilità di rispondere alle terapie mentre le lesioni inattive-croniche difficilmente rispondono e quindi in questi casi è indicata solo una terapia di supporto.

Possono essere utilizzati anche parametri clinici e bioumorali per valutare la severità del quadro clinico. Proteinuria, sedimento urinario attivo, insufficienza renale, ipertensione arteriosa di recente insorgenza, o, in alternativa, parametri extrarenali come l'andamento del titolo anticorpale, in particolare quello dell'anti-DNA nativo o il riscontro di altre manifestazioni cliniche legate al LES sono tutti parametri di estrema utilità per formulare un giudizio clinico.

La classe I generalmente non richiede nessun trattamento di particolare impegno.

La terapia della GN lupica di classe II, mesangiale, è basata generalmente sulla somministrazione di cortisone a dosi comprese tra 0,5 e 1 mg/kg/die.

La forma di classe III, proliferativa focale, gode di una buona prognosi quando le lesioni coinvolgono meno del 50% della superficie glomerulare, in tal caso è indicata una terapia analoga a quella della GN mesangiale. Tuttavia qualora le lesioni fossero estese oltre la metà della superficie del glomerulo, la prognosi ed il trattamento dovrebbero essere simili a quelli della classe IV.

La GN proliferativa diffusa (classe IV) è la forma di interessamento renale più frequente in pazienti affetti da LES (32); essa purtroppo rappresenta anche l'aspetto più severo della GN lupica. Le linee guida per il trattamento di questa classe di GN derivano da studi condotti presso il *National Institute of Health di Bethesda (NIH)*. Al NIH va anche il merito di aver distinto la terapia della GN in terapia d'induzione e terapia di mantenimento, inizialmente adottato nel trattamento oncologico. La terapia d'induzione per la GN lupica prevede boli endovena di cortisone (metilprednisone), pari a 0,5-1 g/die per tre giorni consecutivi seguiti dalla somministrazione di prednisone, 1 mg/kg/die, che va poi scalato gradualmente sino alla dose minima efficace. Un protocollo alternativo, da riservare alle forme particolarmente gravi, è quello di effettuare il bolo endovena di metilprednisone ogni mese per sei mesi.

Ai corticosteroidi si associano farmaci citotossici tra questi la CYF può essere somministrata per endovena in boli da 0,5-1 g/m<sup>2</sup> al mese per sei-dodici mesi oppure 0,5 g/m<sup>2</sup> ogni 15 giorni per tre-sei mesi; è possibile utilizzare la CYF anche per via orale alla dose di 1,5-2,5 mg/kg/die per due-tre mesi. La terapia di mantenimento si avvale della CYF per boli endovena al dosaggio di 0,5-1 g/m<sup>2</sup> ogni tre mesi per uno-due anni, oppure di AZA per via orale alla dose di 1,5-2,5 mg/kg/die (55,56), o di CYA con dosi di 3-4 mg/kg/die.

La terapia della GN di classe V (membranosa), così come quella per la GN membranosa idiopatica, rimane tuttora oggetto di controversia. Si tratta, infatti, di una forma di GN ad evoluzione particolarmente lenta e per questo alcuni Autori sconsiglierebbero l'uso di una terapia immunosoppressiva, viste le possibili complicanze. È stato infatti osservato come i pazienti affetti da GN membranosa soffrano più spesso per le complicanze della sindrome nefrosica che non per



evoluzione della nefropatia stessa. Secondo altri, l'associazione tra farmaci immunosoppressori e corticosteroidi sarebbe più efficace dei soli corticosteroidi nel trattamento della sindrome nefrosica e nello stabilizzare la funzione renale (57,58). Il farmaco che sembra più efficace nel trattamento della GN membranosa lupica è la CYA (59).

### **Prognosi della GN lupica**

Negli ultimi decenni la frequenza di evoluzione della GN lupica in insufficienza renale terminale si è ridotta per effetto di terapie sempre più efficaci: essa è passata da una percentuale del 16% nel 1981 al 2,2% nel periodo compreso tra 1987 e il 1991. La GN lupica evolve più frequentemente in insufficienza renale terminale in pazienti che hanno elevati livelli di creatinemia ( $>130 \mu\text{mol/l}$ ), scarsa risposta al trattamento, alto indice di cronicità e frequenti riacutizzazioni (60-62). Altri fattori prognostici negativi sono l'ipertensione arteriosa e la dislipidemia. Il trattamento di queste complicanze riduce il rischio di evoluzione verso la fase terminale; in particolare il mantenimento della pressione arteriosa a livelli pari a 120/80 mmHg (63-65) con ACE inibitori o con antagonisti dell'angiotensina II sembra prevenire l'evoluzione del danno renale e ridurre l'entità della proteinuria (66).

I pazienti che evolvono verso l'insufficienza renale terminale sono sottoposti a trattamento dialitico. Di questi il 20-30% muore nell'arco di tre-sei mesi per infezioni, riacutizzazioni della malattia di base, oppure problemi correlati alla fistola arterovenosa; un altro 20-30% dei casi recupera la funzione renale ed interrompe la dialisi; infine nel 40-60% dei pazienti si assiste ad una remissione della malattia di base (61,67,68).

Negli Stati Uniti circa un terzo dei pazienti in regime dialitico viene sottoposto a trapianto renale, nel 10% dei casi da donatore vivente

consanguineo e nel 20% da cadavere. L'ampio spettro di anticorpi diretti contro antigeni di istocompatibilità che si osserva in pazienti affetti da LES è un fattore limitante poiché riduce il numero dei donatori compatibili per il trapianto (69). La mortalità dei pazienti sottoposti a trapianto renale per GN lupica rispecchia quella degli altri pazienti che ricorrono alla terapia sostitutiva ed ammonta al 20% (70,71), anche la percentuale di rigetto ricalca quella del resto della popolazione ed è pari al 40% nel trapianto da cadavere e al 25-30% nel trapianto da consanguineo vivente. La sopravvivenza del trapianto a cinque anni è del 58,1% nel trapianto da cadavere e del 77% se l'organo proviene da donatore vivente. La recidiva della GN lupica è rara e si presenta solo nel 2-4% dei trapiantati.

# **GLI IMMUNOSOPPRESSORI PIU' UTILIZZATI NELLA TERAPIA DELLA GN LUPICA**

## **CICLOFOSFAMIDE**

È un farmaco citotossico impiegato generalmente nella terapia delle neoplasie e delle malattie autoimmuni. È un estere ciclico della mecloretamide inizialmente sintetizzato e sviluppato con l'intento di migliorare la selettività delle mostarde azotate. Molte cellule tumorali, infatti, sono particolarmente ricche di fosfamidasi e fosfatasi, cioè di sistemi enzimatici responsabili della sua attivazione (72).

### ***Farmacocinetica e farmacodinamica***

L'attivazione della ciclofosfamide (CYF) dipende innanzitutto dal metabolismo a 4-idrossiCYF e aldofosfamide con i quali si mantiene in equilibrio; i due metaboliti sono poi ossidati dall'aldeide deidrogenasi a 4-chetoCYF e carbossiCYF con un effetto tossico molto limitato. Una quota di aldofosfamide viene trasformata in sede intracellulare in acroleina e in mostarda fosfaramidica; l'ultima, essendo un alchilante bifunzionale, viene considerata il vero principio attivo della CYF (73). L'acroleina è un alchilante monofunzionale direttamente responsabile dell'azione citotossica del farmaco; tale metabolita essendo una molecola deplettrice di gruppi sulfidrilici provoca carenza di glutazione ridotto e quindi una deficitaria capacità di riparazione del danno cellulare indotto dalla fosforamide. L'acroleina viene secreta come tale nelle urine dove in caso di elevata concentrazione determina uno dei suoi effetti collaterali più noti: la cistite emorragica.

La CYF può essere somministrata sia per via parenterale (endovenosa) sia per via orale, nell'ultimo caso però l'assorbimento varia dal 70 al

90% della dose. Il composto primario non è attivo e la cospicua quantità di metaboliti che ne derivano rende difficile uno studio farmacocinetico. Sia la CYF che i suoi derivati si legano alle proteine plasmatiche in percentuale pari al 50% e vengono escreti quasi esclusivamente per via renale. Il farmaco ha un'emivita di cinque-sei ore.

### ***Effetti terapeutici***

La CYF impedisce la replicazione del DNA e quindi antagonizza il normale ciclo cellulare. La capacità del farmaco di interferire con i processi mitotici e con la proliferazione cellulare di tessuti ad alto *turn-over* cellulare costituisce il meccanismo responsabile dell'efficacia terapeutica della CYF, ma risulta anche alla base dei suoi più frequenti effetti avversi.

L'attività immunosoppressiva della CYF è più marcata per i linfociti T *suppressor* e T CD4+, tuttavia sembra che il farmaco sia in grado di sopprimere anche la proliferazione della linea B, inibendo quindi sia l'immunità cellulo-mediata sia quella umorale. Va inoltre ricordato che a dosi relativamente basse la CYF aumenta l'attività delle cellule NK (*natural killer*) e dei macrofagi, ed ha un'attività sinergica con le cellule LAK (*lymphokine activated killer cells*).

La CYF è uno dei farmaci più usati nel trattamento oncologico sia in età adulta sia in quella pediatrica. Il farmaco, per le sue proprietà immunosoppressive, è comunemente usato in malattie ad eziologia autoimmune come nel LES, nella polimiosite, nella sclerosi sistemica e nelle vasculiti ANCA associate. La CYF è inoltre impiegata per prevenire il rigetto nel trapianto.

### ***Indicazioni terapeutiche***

La principale indicazione all'uso di CYF nella GN lupica è il riscontro istologico di una classe di tipo III o IV. Grazie all'impiego della CYF

la prognosi della GN proliferativa è notevolmente migliorata. Vi sono tuttavia alcune questioni irrisolte che riguardano la modalità d'impiego di questo farmaco. In particolare non è ancora chiaro se la CYF debba essere impiegata anche nelle forme proliferative di lieve entità; se sia preferibile somministrare il farmaco per via endovena o per via orale; se infine la CYF debba essere impiegata solo nella terapia d'induzione o anche nella terapia di mantenimento come suggerito dal NIH.

Secondo un'indagine eseguita nei principali centri europei che si occupano di LES, la maggior parte degli specialisti impiega lo stesso regime terapeutico per la GN proliferativa lieve e per quella grave, e preferisce somministrare la CYF per boli endovenosa per ridurre al minimo gli effetti collaterali. Poiché la tossicità della CYF dipende dalla dose cumulativa e le recidive della GN sono frequenti, sembra più indicato usare il farmaco solo nella terapia d'induzione della remissione (54,74,75,76,77).

Purtroppo la CYF non è efficace in tutti i pazienti; sembra che alcune popolazioni come quella afro-americana risultino particolarmente resistenti alla terapia di induzione della remissione basata sull'impiego di tale farmaco (78).

### ***Effetti collaterali***

La tossicità della CYF si manifesta principalmente a carico del sistema emopoietico dove interessa tutte le linee cellulari, ma colpisce prevalentemente quella granulocitaria. La tossicità dose-limitante è rappresentata dal *nadir* dei neutrofili che si verifica tra VIII e XIV giorno dopo la somministrazione. Tuttavia il farmaco non arreca un danno tossico permanente al midollo osseo poiché i precursori ematopoietici possiedono elevate quantità di aldeide deidrogenasi e

questo permette loro il ripristino delle linee midollari dopo somministrazione di fattori di crescita come: G-CSF e GM-CSF.

Altri effetti collaterali sono nausea e vomito che generalmente si manifestano dopo otto ore dall'assunzione soprattutto se si utilizzano dosi elevate. Frequente risulta anche l'alopecia. Per quanto riguarda le reazioni avverse acute ricordiamo orticaria, edema angioneurotico e *shock* anafilattico che, pur presentandosi raramente, impongono un adeguato monitoraggio durante la somministrazione; tra gli effetti tossici acuti dobbiamo menzionare anche la cardiotossicità che si presenta sotto forma di infarto miocardico massivo con emorragia interstiziale, edema e versamento pericardico, a prognosi spesso infausta. Tra gli effetti indesiderati subacuti vanno annoverate le mucositi del cavo orale, faringe ed esofago che possono assumere carattere necrotizzante compromettendo l'alimentazione e la funzione di barriera contro i microrganismi. Tra gli apparati più colpiti dagli effetti indesiderati ricordiamo le gonadi con insorgenza di azo- ed oligo-spermia nel maschio ed amenorrea nella donna conseguenti ad atrofia gonadica; per tale motivo la reversibilità non risulta sempre possibile. Il farmaco è teratogeno e l'assunzione nel primo trimestre di gravidanza provoca gravi malformazioni fetali. Caratteristico è l'interessamento delle vie urinarie con il quadro della cistite emorragica. Per proteggere le vie urinarie si somministra il 2-mercapto-etan-sulfonato-sodico (MESNA). Qualora si instauri la cistite emorragica, essa può evolvere in carcinoma a cellule transizionali della vescica. A livello dei tubuli renali può verificarsi una sindrome da inappropriata ritenzione idrica che, unita all'idratazione per prevenire gli effetti tossici sulle vie urinarie, può portare a severa iponatriemia che, come noto, può portare a danno cerebrale.

Tra le interazioni farmacologiche, l'allopurinolo ha la capacità di prolungare la persistenza in circolo dei metaboliti della CYF; i farmaci che modulano l'attività dei microsomi epatici come i barbiturici e la fenitoina sono in grado di accelerare il metabolismo del farmaco che può risultare meno efficace e meno tossico. Al contrario, i corticosteroidi riducono l'attività microsomiale e quindi possono dare una riduzione dell'attivazione del farmaco.

## **CICLOSPORINA A**

Le ciclosporine sono un gruppo di metaboliti isolati dal micete *Hypoclaudium inflatum gams* ed agiscono come immunosoppressori.

### ***Farmacocinetica e farmacodinamica***

La ciclosporina A (CYA) è un antibiotico peptidico costituito da 11 aminoacidi, liposolubile e a carica neutra. Dopo somministrazione orale la CYA viene assorbita a livello del tenue in modo parziale; la sua biodisponibilità, infatti, è pari al 25-50%. Il picco di concentrazione ematica viene raggiunto dopo 2-4 ore (per ottenere un picco più rapido è disponibile una formulazione farmaceutica particolare: microemulsione preconcentrata denominata "neoral") e la sua emivita è di circa 24 ore. La CYA viene metabolizzata e quindi inattivata dai citocromi p450; l'escrezione è per il 90% biliare ed è soggetta a ricircolo enteroepatico e per il 10% renale (79,80).

### ***Effetti terapeutici***

La CYA agisce inibendo la proliferazione dei linfociti T, soprattutto i T helper, impedendo la trascrizione del DNA nelle cellule T attivate e quindi la produzione di RNA messaggero per la sintesi di diverse citochine tra cui l'interleuchina 2 (IL-2) (81,82). La CYA penetra attraverso la membrana cellulare e si lega a livello citoplasmatico ad un'immunofillina, chiamata ciclofillina; il complesso CYA-ciclofillina

inibisce l'attività fosfatase della calcineurina, enzima responsabile dell'attivazione di NFAT (*nuclear factor of activated T cell*). Normalmente NFAT defosforilato si lega al DNA a livello del promotore del gene di IL-2 permettendo quindi la trascrizione ed in ultima la sintesi di IL-2 e IL-4.

Recentemente è stato dimostrato che il farmaco è in grado di bloccare l'attivazione delle vie del segnale di altre proteine come JNK (*Janus kinase*) e la p38 (83). Queste due vie sono attivate durante la risposta infiammatoria o durante l'apoptosi; JNK e p38 appartengono, infatti, alla famiglia delle MAPK (*mitogen activated protein kinase*) che oltre ad essere coinvolte nella risposta antigene dipendente dei linfociti T attivati sono espresse nelle condizioni di stress.

Sembra inoltre che la ciclosporina sia in grado di interferire, anche se in misura minore, con la produzione di altre citochine quali IFN $\gamma$ , GM-CSF, IL4, IL3 e TNF $\alpha$  nei linfociti T e IL5, IL6, IFN $\gamma$  e TNF $\alpha$  nei mastociti. Vi sono evidenze sperimentali che dimostrano come la CYA inibisca maggiormente le citochine e le risposte immunitarie legate alle reazioni di tipo Th1 rispetto a quelle Th2; essa inoltre esercita un effetto antinfiammatorio poiché riduce la produzione di GM-CSF e l'espressione delle E-selectine sull'endotelio, antagonizzando la marginazione dei granulociti neutrofili. La CYA modula le interazioni B-T grazie alla riduzione dell'espressione del CD40L sulla superficie dei linfociti T attivati e delle cellule NK attivate. Il CD40L, espresso sui linfociti T, si lega al CD40, espresso sui linfociti B fornendo un segnale costimolatorio necessario per la produzione delle immunoglobuline e per lo *switching* isotipico. La CYA determina una *down regulation* dell'espressione delle molecole MHC di classe II ed una riduzione della sintesi di prostaglandina E2 e dell'attivazione dei monociti macrofagi (84).



### ***Indicazioni terapeutiche***

Oltre che nel LES è impiegata in altre malattie autoimmuni come artrite reumatoide, diabete mellito di tipo I, uveite e psoriasi (79,80).

Nel LES, oltre ad essere utilizzata nella terapia di mantenimento della GN, viene impiegata nel trattamento delle forme articolari non responsive agli antimalarici da sola o in associazione con il methotrexate. Il farmaco è inoltre utilizzato nel trattamento delle piastinopenie ed in linea generale, a basso dosaggio, in tutte le forme lievi di malattia in cui è necessario l'uso di un immunosoppressore per inefficacia od intolleranza dell'antimalarico di sintesi.

### ***Effetti collaterali***

Uno degli effetti tossici più temibili è la nefrotossicità che si manifesta con un quadro di insufficienza renale di tipo funzionale, quindi reversibile con la sospensione del farmaco. Altri effetti collaterali piuttosto comuni sono: ipertensione arteriosa, nausea, vomito, iperglicemia, iperlipidemia, ipertricosi e disfunzione epatica transitoria. Risulta scarsa la tossicità midollare. Nei soggetti che assumono CYA come terapia anti-rigetto è stato segnalato un lieve aumento dell'incidenza dei linfomi.

## **AZATIOPRINA**

L'azatioprina (AZA) è un imidazolil derivato dalla mercaptopurina (6-mercaptopurina) e il suo meccanismo d'azione rispecchia quello di un analogo strutturale o antimetabolita.

### ***Farmacocinetica e farmacodinamica***

L'AZA, assunta per via orale, è ben assorbita nel tratto gastrointestinale e una volta guadagnato il circolo ematico si lega alle proteine plasmatiche in quantità pari al 30%. *In vivo* viene trasformata a livello del fegato e degli eritrociti in 6-mercaptopurina, suo

metabolita attivo, che viene poi metabolizzata da parte della xantinossidasi in acido 6-tiourico e successivamente eliminata per via renale. Una piccola parte viene escreta immodificata.

### ***Effetti terapeutici***

Essendo un analogo delle purine viene incorporata nel DNA e nel RNA durante la duplicazione e la sintesi proteica. L'AZA ha una potente azione sul sistema immunitario, agendo soprattutto sui linfociti B e T attivati, sulle cellule NK, sulla migrazione dei neutrofili e sulla proliferazione delle cellule endoteliali. L'AZA agisce soprattutto sulle risposte secondarie, ossia conseguenti all'esposizione all'antigene, ma è in grado di sopprimere anche le risposte di tipo primario. Inoltre l'AZA è capace di inibire completamente la comparsa *de novo* delle risposte cutanee ritardate, mentre non ha effetto su quelle già in atto che abbiano raggiunto una certa stabilità. L'attività antinfiammatoria di questo farmaco è blanda ed è legata all'inibizione della replicazione cellulare a livello dei precursori dei monociti, cui consegue un minore reclutamento degli stessi nei siti d'infiammazione (84).

### ***Indicazioni terapeutiche***

L'azatioprina è un immunosoppressore molto utilizzato nel trattamento delle malattie reumatiche sistemiche. Nel LES viene usato per controllare l'attività della malattia, specialmente nelle forme severe. È l'immunosoppressore di riferimento per gli studi clinici riguardanti nuove molecole ad attività immunosoppressiva.

### ***Effetti tossici***

Gli effetti collaterali più comunemente osservati sono la mielodepressione, in particolare neutropenia, ma anche anemia e trombocitopenia, e la tossicità epatica che si manifesta con subittero ed elevati livelli plasmatici di fosfatasi alcalina e degli altri enzimi

epatici. Altri effetti indesiderati sono: nausea, vomito, diarrea, eruzione cutanea, alopecia.

La somministrazione contemporanea di allopurinolo aumenta la biodisponibilità del farmaco e perciò è necessario ridurre la dose di azatioprina ad un terzo od un quarto rispetto al dosaggio abituale (85,86).

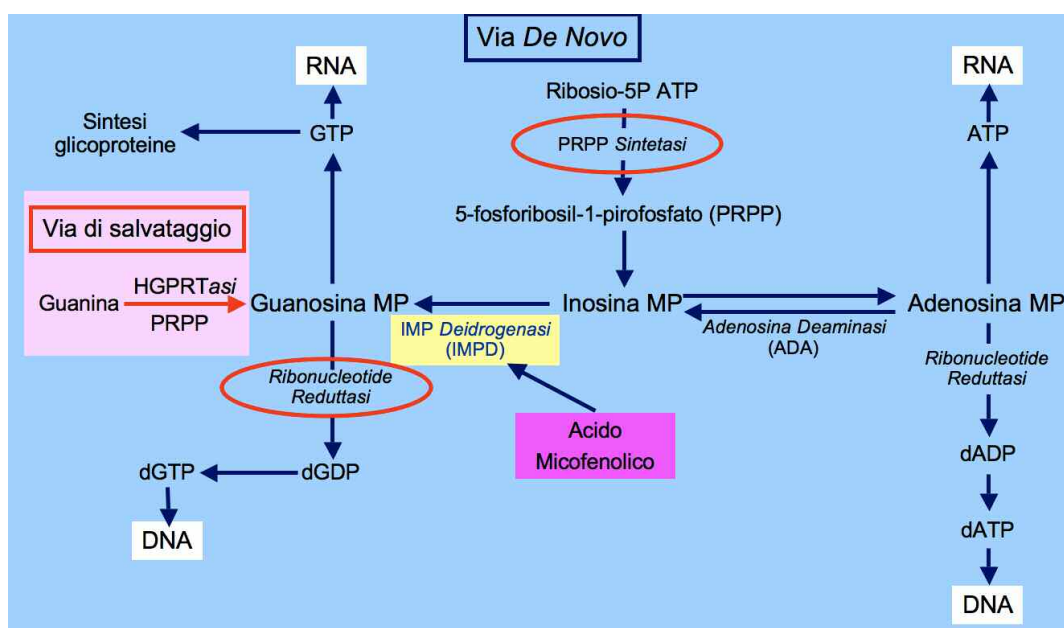
# IL MICOFENOLATO MOFETILE

## Il farmaco

Il MMF è un derivato semisintetico dell'acido micofenolico, isolato dalla muffa di *Penicillium glaucum*. Tale acido è un inibitore reversibile e non competitivo dell'enzima inosina monofosfato deidrogenasi (IMPDH).

## Meccanismo d'azione

Il ruolo dell'IMPDH è quello di trasformare l'inosina monofosfato in guanosina monofosfato. L'inibizione di tale enzima determina un blocco della sintesi delle purine e quindi del DNA, con arresto della proliferazione cellulare (87) (Figura 3). Alcune cellule sono in grado di utilizzare la via di recupero delle purine che porta alla sintesi di guanosina ad opera dell'ipoxantina-guanina fosforibosil-transferasi e della fosforibosil-pirofosfato sintetasi. La sensibilità all'acido micofenolico varia a seconda della capacità da parte della cellula di utilizzare la via di recupero.



**Figura 3. Meccanismo d'azione MMF**

Via di sintesi delle purine: a sinistra la via di salvataggio, a destra la via *de novo*.

I linfociti T e B sono cellule che utilizzano principalmente la via “*de novo*” della sintesi delle purine e risultano quindi le cellule maggiormente soggette all’inibizione dell’enzima IMPDH. Nell’organismo umano sono presenti due isoforme dell’enzima: la prima costitutivamente attiva e presente in tutte le cellule, la seconda di tipo inducibile. È stato dimostrato che stimolazione dei linfociti *in vitro*, indotta con fitoemoagglutinina o dal virus di Epstein–Barr, determina aumento dell’espressione dell’isoforma inducibile della IMPDH (87,88). È stato inoltre provato che tra i due tipi di enzima quello inducibile è circa cinque volte più sensibile all’azione dell’acido micofenolico (MPA) rispetto alla forma costitutiva ed è quindi per tale motivo che l’acido micofenolico risulta un potente citostatico per i linfociti attivati. Il blocco della sintesi delle purine determina l’arresto della replicazione cellulare in fase S e quindi l’arresto della proliferazione clonale del linfocita T (87,89).

Vi sono altri meccanismi d’azione dell’acido micofenolico che contribuiscono a spiegarne l’effetto immunosoppressivo. In primo luogo il MMF induce l’apoptosi dei linfociti T attivati in risposta ad uno stimolo antigenico, che rappresenta uno dei principali meccanismi con cui si instaura la tolleranza immunologica (90). In secondo luogo inibisce la differenziazione, la maturazione e la funzione allostimolatoria delle cellule dendritiche di derivazione monocitaria (91). Inoltre, interferisce con la funzione delle cellule dendritiche senza inibirne la maturazione (92), inibisce la produzione di cellule mesangiali murine ed umane (93), inibisce la glicosilazione delle molecole di adesione (93), inibisce l’esposizione di alcune molecole sulla superficie dei monociti che ne permettono la emarginazione (89). Infine, agendo sulla ossido nitrico sintetasi inducibile, diminuisce la

produzione di perossinitriti e di conseguenza i danni indotti sulle cellule dagli stessi (94). A tal proposito è stato recentemente dimostrato che nei pazienti affetti da LES il processo aterosclerotico, è accelerato e quindi l'inibizione della iNOS da parte del MMF potrebbe essere utile nella prevenzione degli eventi cardiovascolari (95). Più recentemente si è visto che il MMF è in grado di ridurre la produzione di endotelina I da parte delle cellule endoteliali e nelle cellule epiteliali renali (96) ed induce “*down regulation*” della produzione di TGF $\beta$  a livello renale e polmonare (97).

### ***Farmacocinetica e farmacodinamica***

Il MMF somministrato per via orale viene rapidamente assorbito e successivamente convertito, dalle esterasi plasmatiche, in acido micofenolico suo metabolita attivo. La biodisponibilità del MMF è pari al 95% nei soggetti sani e ad un 80% nei trapiantati. Una volta in circolo il farmaco si lega all'albumina in una percentuale pari al 97%. Studi *in vitro* hanno dimostrato che solo la quota libera di tale principio attivo è in grado di inibire l'enzima IMPDH (87). Dopo somministrazione orale, il primo picco di concentrazione plasmatica viene raggiunto dopo circa un'ora, successivamente si ha un rapido declino della concentrazione plasmatica seguito da un secondo picco dopo 6-12 ore, dovuto al ricircolo entero-epatico.

MPA viene metabolizzato in un derivato inattivo dalla UDP-glucosiltransferasi a livello di fegato, polmone e tratto gastrointestinale. Un ruolo importante nella farmacocinetica del MMF è svolto dal ricircolo entero-epatico poiché una volta escreto con la bile MPA-glucuronide viene riconvertito nuovamente in acido micofenolico, suo precursore, grazie all'azione delle glucuronidasi della flora intestinale (98,99).

L'escrezione avviene per il 94% a livello renale e per il 6% con le feci.

## **Ruolo del micofenolato mofetile nella GN lupica: analisi della letteratura**

Il MMF è un farmaco immunosoppressore utilizzato nella terapia di prevenzione del rigetto nei trapianti di rene, fegato e cuore. Per la buona tollerabilità ed efficacia nel ridurre l'incidenza del rigetto acuto, il MMF è risultato superiore rispetto ai farmaci tradizionali (100).

Nei modelli murini di LES, il MMF è risultato efficace nel diminuire il titolo anticorpale dell'anti-DNA nativo e prevenire il danno renale, ritardare la comparsa della proteinuria o ridurre l'entità della stessa. Come risultato finale il MMF è risultato efficace nell'aumentare la sopravvivenza delle cavie (101,102).

Negli ultimi anni il MMF è emerso come alternativa terapeutica nei pazienti con manifestazioni del LES refrattarie al trattamento con terapia standard. L'impiego del MMF è risultato efficace sul controllo della malattia e generalmente ben tollerato.

La prima esperienza con il MMF fu descritta nel 1998 da Glicklich ed Acharya che osservarono una favorevole risposta in quattro pazienti affetti da GN lupica refrattaria al trattamento con CYF endovena (103).

Con uno studio retrospettivo su 13 pazienti con GN lupica di grado IV-V Dooley et al. nel 1999 hanno riscontrato una buona efficacia e tollerabilità del farmaco. I pazienti erano stati trattati con CYF e successivamente con MMF e cortisone per un tempo variabile dai 3 ai 24 mesi (media 12,9). A livello bioumorale sono stati osservati: una

riduzione della creatinina e del titolo degli anticorpi anti-nDNA, un incremento del C3 e una diminuzione della proteinuria (104).

Gaubitz et al. (105) hanno trattato con MMF un gruppo di 10 pazienti affetti da LES con GN refrattaria alla terapia convenzionale, dimostrando l'efficacia del farmaco nel ridurre che l'attività della malattia, calcolata con l'*European Consensus Study Group for Disease Activity* (ECLAM), e nel migliorare la funzionalità renale.

Chan et al. (106) hanno condotto uno studio prospettico su 42 pazienti asiatici. Metà di questo gruppo aveva assunto 2 g/die di MMF per i primi sei mesi e poi 1 g/die per altri sei mesi; all'altra metà dei casi era stata somministrata CYF per os per sei mesi e AZA per altri sei mesi. L'efficacia del trattamento nei due gruppi è risultata sovrapponibile, tuttavia i pazienti che avevano assunto MMF la frequenza delle complicanze dovute alla tossicità del farmaco è risultata inferiore. Un successivo controllo a 36 mesi degli stessi pazienti ha mostrato come coloro che avevano inizialmente assunto MMF avessero sviluppato una riacutizzazione renale con una frequenza più elevata, rispetto a coloro che avevano inizialmente assunto CYF, dimostrando la superiorità della CYF rispetto al MMF quale farmaco d'induzione della remissione della GN lupica.

In uno studio retrospettivo su 13 pazienti, Kingdon et al. (107), hanno dimostrato come il MMF somministrato nella terapia di mantenimento della GN per un periodo medio di 25 mesi fosse efficace nel ridurre significativamente la comparsa di insufficienza renale consentendo una diminuzione della dose di cortisone.

Karim et al. (108) hanno somministrato MMF a 21 pazienti affetti da LES (di cui 13 con impegno renale) non rispondenti alla terapia standard, per un periodo medio di 14 mesi, e hanno osservato una



riduzione significativa dei livelli di proteinuria, dell'indice ECLAM e della dose di cortisone assunto dai pazienti.

Glinzer et al. 2003 (109), hanno valutato con uno studio multicentrico, prospettico, randomizzato su 140 pazienti, l'efficacia del MMF assunto alla dose di 3 g/die, nella terapia d'induzione della remissione della GN confrontando con la terapia tradizionale a base di CYF per via endovenosa. Dopo i sei mesi di trattamento, il MMF è risultato più efficace della CYF nell'indurre la remissione completa della GN. Il MMF è inoltre risultato meglio tollerato rispetto alla CYF.

Nello studio di Kapitsinou et al. (110) il MMF è risultato efficace e ben tollerato in 18 pazienti con GN resistenti alla terapia tradizionale. Nove pazienti avevano una GN proliferativa focale, 3 una GN proliferativa diffusa, 6 una GN membranosa. Tutti i pazienti sono stati trattati per 15 mesi con una dose pari a 2g/die. La remissione completa è stata osservata nel 56% dei casi. Da sottolineare che i 4 pazienti non responsivi al MMF presentavano tutti un quadro istologico di GN membranosa.

Contreras et al. (111) hanno condotto uno studio comparativo, prospettico, randomizzato, monocentrico, per valutare l'efficacia del MMF *versus* AZA e CYF endovena nella terapia di mantenimento della GN lupica di tipo proliferativo. Sono entrati nello studio 59 pazienti: 12 con GN di classe III, 46 con GN di classe IV, ed uno con GN di classe V. Dopo una terapia d'induzione con CYF per via endovenosa, 20 pazienti hanno assunto MMF per via orale 2 g/die, 19 AZA per os, 20 CYF endovena. Il MMF e l'AZA si sono dimostrati più efficaci e sicuri della CYF. Nei pazienti che avevano assunto AZA e MMF è stata riscontrata una minore frequenza di mortalità e di insufficienza renale cronica rispetto ai pazienti che avevano assunto CYF.

Ong et al. (112) hanno condotto uno studio su 44 pazienti con diagnosi recente di GN di classe III o IV, divisi in maniera randomizzata in due gruppi uno dei quali è stato trattato per sei mesi con CYF e l'altro con MMF, entrambi associati a corticosteroidi. Si sono riscontrate le seguenti percentuali di remissione parziale: 53% nel primo sottogruppo e 58% nel secondo; per quanto riguarda la remissione completa: 12% nel primo gruppo e 26% nel secondo. Quindi anche in questo studio il MMF è risultato efficace nella terapia d'induzione.

Chan et al. (113) hanno pubblicato nel 2005 i risultati di uno studio randomizzato su 64 pazienti seguiti per un periodo medio di 63 mesi. I pazienti sono stati randomizzati in due gruppi, il primo trattato con CYF in boli endovena per sei mesi e successivamente con AZA, il secondo con MMF per i primi 12 mesi e poi con AZA. Oltre il 70% dei pazienti ha raggiunto una remissione parziale e oltre il 20% una remissione completa. Durante la fase di mantenimento, entrambi i regimi si sono dimostrati efficaci nel mantenere la remissione della GN e nell'impedire l'evoluzione verso l'insufficienza renale.

Glinzer et al. (114) a due anni di distanza dalla loro precedente analisi preliminare hanno pubblicato i risultati dello studio randomizzato su 140 pazienti, dei quali 71 trattati con 3g/die di MMF e 69 con boli mensili di CYF endovena. Settantasei pazienti avevano una GN proliferativa, 22 una GN focale, 27 una GN membranosa e 15 una GN membranoproliferativa. È stata osservata una remissione completa nel 22,5% dei pazienti che hanno assunto MMF e nel 5,8% di coloro che avevano assunto CYF. Quindi il MMF è risultato più efficace nell'indurre la remissione della GN nei pazienti affetti da LES rispetto al trattamento tradizionale con CYF endovena.

## **Ruolo del MMF sulle manifestazioni extrarenali del lupus eritematoso sistemico**

### ***Manifestazioni cutanee***

Le manifestazioni cutanee sono frequenti nel LES e vengono classificate in acute, subacute e croniche. Nella maggior parte dei pazienti il trattamento delle manifestazioni cutanee si basa sulla protezione dai raggi solari, sul corticosterone per via topica e sugli antimalarici. Talvolta, anche se di rado, le lesioni possono risultare refrattarie a tale trattamento e sono trattate con farmaci di seconda linea. Tra questi vi è la Talidomide che è molto attiva sulle lesioni cutanee, ma gravata da frequenti effetti collaterali che ne limitano l'impiego come la neuropatia periferica.

Non vi sono molti studi sull'efficacia del MMF nel trattamento delle lesioni cutanee del LES. Alcuni dimostrano l'efficacia del trattamento con MMF ad un dosaggio di 2-3 g/die (115), mentre, altri come Pisoni et al. (116) riportano un miglioramento incompleto e temporaneo in soli due casi su sette.

### **Manifestazioni ematologiche**

Anemia emolitica e trombocitopenia sono considerate manifestazioni gravi del LES. Una conta piastrinica al di sotto di 20.000/mm<sup>3</sup> si osserva nel 5-10% dei pazienti durante le riacutizzazioni della malattia. Generalmente il primo approccio terapeutico è rappresentato dal cortisone ad alto dosaggio (1 mg/kg/die) cui segue l'assunzione di AZA oppure CYA. Talvolta la gravità del caso rende necessaria la somministrazione di IVIG ad alte dosi per far fronte alla rapida riduzione del numero di piastrine. Qualora la piastrinopenia risulti refrattaria anche a quest'ultimo trattamento è possibile effettuare la splenectomia. Attualmente solo pochi casi di trombocitopenia trattati con MMF sono riportati in letteratura. Si tratta di pazienti non

responsivi alla terapia tradizionale. Gaubitz (117), Vasoo (118), Chang (119) e Pisoni (116) hanno riportato un aumento della conta piastrinica dopo la terapia con MMF nei pazienti affetti da LES.

L'anemia emolitica si osserva nel 5-10% dei pazienti, il trattamento dell'anemia emolitica prevede l'impegno di alte dosi di cortisone che risulta efficace nel 70-75% dei casi. I pazienti che non rispondono al cortisone possono essere trattati con AZA, CYA, IVIG, o danazolo e, se anche questi si dimostrassero inefficaci è indicata la splenectomia. Alba et al. (120), Howard et al. (121) e Pisoni et al. (116) hanno trattato cinque pazienti affetti da anemia emolitica con dosi di MMF pari a 2 g/die con normalizzazione dei livelli di emoglobina. Nonostante questi risultati siano incoraggianti sono necessari ulteriori studi per definire il ruolo del MMF nel trattamento delle manifestazioni ematologiche del LES.

### **Manifestazioni polmonari**

La più frequente manifestazione dell'interessamento polmonare da parte del LES è la pleurite. Altre manifestazioni sono la tuttavia la polmonite interstiziale acuta o cronica e l'ipertensione polmonare. Generalmente la pleurite è sensibile al trattamento con antinfiammatori non steroidei (FANS), cortisone ed idrossiclorochina, mentre l'ipertensione polmonare e le polmoniti interstiziali sono spesso resistenti sia al cortisone sia agli immunosoppressori, inclusa la CYF. Pochissimi casi con interessamento polmonare sono stati trattati con MMF. Tra questi un ragazzo di 14 anni affetto da emorragia alveolare, GN severa ed interessamento ematologico, è stato trattato con successo con MMF endovena alla dose di 1 g/die da Samad et al. (122). Anche Pisoni et al. (116) hanno trattato un paziente con polmonite interstiziale cronica con MMF osservando un aumento successivamente un aumento della diffusione del monossido di

carbonio. Studi sperimentali hanno dimostrato che il MMF è in grado di ridurre l'espressione del TGF $\beta$  in reni di cavie affette da fibrosi glomerulare indotta da ciclosporina (123,124), e più recentemente anche a livello del tessuto polmonare di topi MRL/lpr.

Poiché il TGF $\beta$  è una citochina che induce una reazione di tipo fibrotico, la sua *down regulation* ad opera del MMF lascia intravedere un possibile ruolo di tale farmaco nel trattamento delle fibrosi polmonari.

### **Manifestazioni neuropsichiatriche**

L'interessamento del sistema nervoso centrale nel LES si manifesta con psicosi, delirium e disfunzioni cognitive globali. Grisanti et al. (125) hanno trattato con successo con MMF un paziente affetto da LES e sindrome da anticorpi antifosfolipidi con coinvolgimento neurologico. Karim et al. (108) e Jose et al. (126) hanno riportato buoni risultati in tre pazienti affetti da turbe neuropsichiatriche trattati con MMF alla dose di 2g/die. Pisoni et al. (116) hanno osservato un caso di una mielite traversa che non è risultato responsivo al MMF.

### **Interessamento articolare**

Gaubitz et al. (105) hanno notato un miglioramento delle manifestazioni articolari dopo il trattamento con MMF in sei pazienti. Negli altri studi l'aspetto articolare è spesso considerato nell'ambito del conteggio degli indici di attività globale della malattia, come l'ECLAM, dai quali risulta difficile estrapolare l'andamento delle singole manifestazioni.

### **Tollerabilità del MMF nei pazienti affetti da LES**

Un recente studio su 140 pazienti ha dimostrato come tra gli effetti avversi quelli più frequentemente osservati siano quelli gastrointestinali (29-39%) come diarrea, nausea, vomito ed infezioni

(23-44%). Nella maggior parte dei casi gli effetti collaterali, di lieve entità, hanno richiesto la sospensione della terapia o una breve ospedalizzazione in una minoranza di casi (127). Negli studi controllati, randomizzati il MMF è risultato meglio tollerato rispetto alle terapie standard e il rischio di infezioni severe è risultato ridotto (106,111,112,113). Nei pazienti con disturbi gastrointestinali è stato spesso sufficiente ridurre la dose di MMF oppure associare un farmaco inibitore di pompa protonica per alleviare la sintomatologia.

Recentemente il largo uso di farmaci immunosoppressori nei soggetti trapiantati e nei pazienti affetti da malattie autoimmuni ha fatto emergere un aumento del rischio di neoplasie, in particolare di tipo linfoproliferativo, in questi pazienti rispetto alla popolazione generale. Anche nelle persone affette da LES è riportata una aumentata frequenza di malattie linfoproliferative (128). In uno studio del 1996 è stata dimostrata una maggiore incidenza di neoplasie linfoproliferative in pazienti trapiantati che assumevano MMF rispetto a quelli trattati con AZA. Tuttavia, un recente studio prospettico condotto su 13.502 pazienti seguiti per un periodo medio di 3,5 anni ha dimostrato una minore incidenza di linfoma ed altre neoplasie in pazienti trapiantati trattati con MMF rispetto a quelli trattati con altri farmaci immunosoppressori (129).

Da ricordare anche alcune segnalazioni di pazienti trapiantati in terapia con MMF, inibitori della calcineurina e corticosteroidi che hanno sviluppato un linfoma del sistema nervoso centrale (130,131).

Infine, tra i pazienti trattati con MMF per GN lupica è stato riportato da Dasgupta et al. (130) un caso di linfoma cerebrale EBV correlato.

## **Ruolo del MMF nel prevenire le manifestazioni severe del LES**

Negli ultimi decenni la sopravvivenza dei pazienti con LES è risulta notevolmente aumentata. Tuttavia come sottolineato da un nostro studio recente (1) contrariamente all'andamento della sopravvivenza a breve e medio termine (sino a quindici anni dalla diagnosi), la sopravvivenza a lungo termine sembra non essersi modificata. Questa discrepanza sembra attribuibile alle manifestazioni gravi del LES come GN, interessamento del SNC, ipertensione polmonare, e l'interstiziopatia polmonare cronica. Nel ridurre la sopravvivenza a lungo termine dei pazienti con LES possono intervenire le complicanze della malattia e gli effetti collaterali della terapia, che possono determinare un aumento delle infezioni (132), un'accelerazione del processo dell'aterosclerosi (95) e probabilmente un aumento dell'incidenza di neoplasie (128).

Grazie alla possibilità di una diagnosi precoce le manifestazioni gravi del LES spesso non sono presenti al momento della prima osservazione. Nella coorte di pazienti seguita presso il nostro Centro su un totale di 338 persone 167 (pari al 49%) avevano interessamento renale; di questi il 57% presentava la GN al momento della diagnosi mentre il 43% ha sviluppato la GN successivamente durante il decorso della malattia.

Attualmente il trattamento delle forme lievi della malattia si basa sull'uso di idrossiclorochina e di basse dosi di corticosteroidi. L'idrossiclorochina risulta efficace nella terapia delle manifestazioni lievi del LES ed inoltre previene la loro comparsa, ma non risulta efficace nel prevenire le complicanze gravi della malattia (133).

Alcuni studi hanno dimostrato come la somministrazione di MMF al dosaggio di 2 g/die per sei mesi dopo un aumento del titolo degli anti-nDNA fosse efficace nel prevenire la riacutizzazione della malattia (30). Tale risultato sembra particolarmente incoraggiante ma

indubbiamente non sufficiente a giustificare l'impiego del MMF in pazienti con forme lievi con lo scopo di prevenire le acuzie o l'evoluzione verso una forma grave di malattia.



## SCOPO DELLA TESI

Grazie ai nuovi regimi terapeutici, la prognosi della GN lupica è notevolmente migliorata e di conseguenza anche gli obiettivi terapeutici sono diversi da quelli del passato. Oggi ci si propone di raggiungere rapidamente la remissione, prevenire le riacutizzazioni e ridurre la morbilità indotta dai farmaci.

Il MMF attualmente si propone come nuovo farmaco immunosoppressore nella terapia della GN lupica.

Le attuali linee guida per il trattamento della GN lupica derivano dagli studi condotti presso l'NIH di Bethesda (76,77,134,80). Per la GN proliferativa (classe III e IV), che rappresenta la forma più frequente di GN lupica, sono previste una fase d'induzione ed una di mantenimento della remissione che si basano sull'impiego di cortisone ed immunosoppressori. Il farmaco considerato "*gold standard*" per la terapia d'induzione è la CYF (57,58,76,134,81-84).

Le evidenze scientifiche finora disponibili sembrano indicare che il MMF ha un'efficacia simile o superiore rispetto alla CYF nell'indurre la remissione nei pazienti con GN lupica (114).

Nella terapia di mantenimento della remissione l'impiego della CYF non sembra invece conveniente per gli importanti effetti tossici ad essa correlati. Tra questi dobbiamo ricordare la mielodepressione, le infezioni, le neoplasie e l'insufficienza gonadica. Va inoltre sottolineato come la frequenza di riacutizzazione della GN lupica rimanga elevata nel lungo termine anche nei pazienti trattati con CYF. Per tali ragioni nella terapia di mantenimento della remissione si preferisce l'impiego di immunosoppressori diversi dalla CYF come l'AZA che è tuttora considerata il *gold standard* nella terapia di mantenimento della GN lupica. Un recente studio condotto da Moroni

et al. (135) ha dimostrato che AZA e CYA sono dotati di un'efficacia del tutto simile e possono pertanto essere considerati come due farmaci equivalenti nella terapia di mantenimento della GN lupica.

AZA e CYA pur essendo meglio tollerate rispetto alla CYF non sono tuttavia prive di effetti collaterali. L'AZA può indurre mielodepressione, infezioni ed epatopatia. La CYA può indurre ipertensione arteriosa, mielodepressione, infezioni, ed insufficienza renale. Anche impiegando AZA o CYA dopo una terapia d'induzione con CYF la frequenza di riacutizzazione rimane elevata.

Infine, è importante sottolineare che in letteratura vi sono vari studi che hanno valutato l'uso del MMF nella terapia di induzione (106,111-113), ma vi sono pochi dati riguardanti l'uso del MMF nella terapia di mantenimento della GN lupica (111).

Nel nostro studio ci siamo proposti di valutare l'efficacia e la tollerabilità del MMF nella terapia di mantenimento della remissione della GN lupica. Abbiamo confrontato questo nuovo farmaco con una terapia standard basata sull'impiego di AZA o CYA.

## **MATERIALI E METODI**

Lo studio è stato condotto in collaborazione con le Università di Pisa e di Milano.

Settanta pazienti, tutti di razza caucasica, sono stati reclutati presso la Divisione di Reumatologia dell'Università di Padova, la Divisione di Reumatologia dell'Università di Pisa e la Divisione di Nefrologia dell'Università di Milano. Tutti i pazienti soddisfacevano i criteri di classificazione dell'*American College of Rheumatology* per il LES (136).

Tutti i pazienti al momento del reclutamento presentavano GN proliferativa diffusa, confermata dal referto istologico della biopsia

renale eseguita nei sei mesi precedenti l'arruolamento. La coorte comprendeva sia pazienti con diagnosi recente di GN lupica sia pazienti che presentavano una riacutizzazione dopo un periodo di quiescenza.

Sono stati ammessi allo studio soggetti di ambo i sessi. Per ciò che concerne le donne in età fertile sono state reclutate solo quelle il cui test di gravidanza è risultato negativo ed abbiano accettato di utilizzare un doppio metodo di barriera come contraccettivo.

Tutti i pazienti hanno firmato il consenso informato.

### **Criteri di inclusione al momento dello screening**

Per essere inclusi nello studio i pazienti dovevano presentare tutti i seguenti criteri: GN di classe III, IV, Vc o Vd secondo la classificazione dell'ISN/IRPS; indice di cronicità  $\leq 4$ ; sedimento urinario attivo (eritrociti per campo  $> 5$ ); proteinuria 24 ore  $>1g/die$  se di recente insorgenza oppure  $2g/die$  in caso di riacutizzazione; creatinina sierica  $\leq 4$  mg/dl.

### **Criteri di esclusione al momento dello screening**

Sono stati esclusi tutti i pazienti che non soddisfacevano i criteri di inclusione dello studio. Abbiamo escluso i pazienti con GN quiescente o con GN non dovuta a LES e i pazienti con neoplasie in atto o pregresse o con controindicazioni all'uso di immunosoppressori.

Sono stati esclusi anche pazienti che avevano assunto immunosoppressori nei sei mesi che precedevano l'induzione e coloro che avevano assunto una dose cumulativa di CYF  $>200$  mg/kg nel corso dei precedenti trattamenti.

## **Criteri di inclusione al baseline**

Abbiamo considerato come *baseline* il momento in cui il paziente aveva iniziato la terapia di mantenimento dopo aver effettuato la fase d'induzione. I criteri di inclusione al *baseline* comprendevano: proteinuria  $>0,5$  g/die in almeno due dosaggi nelle due settimane che precedevano l'inizio della terapia di mantenimento; valori di creatinina sierica  $\leq 1,5$  mg/dl ( $132 \mu\text{mol/l}$ ); pressione diastolica  $\leq 90$  e sistolica  $\leq 140$  mmHg con l'assunzione di non più di due farmaci antipertensivi; dosaggio giornaliero del prednisone  $\leq 0,5$  mg/kg/die.

## **Protocollo terapeutico**

### ***Terapia d'induzione della remissione***

La terapia d'induzione consisteva nella somministrazione di metilprednisolone in boli endovena di 1 g/die per tre giorni consecutivi o 0,5 g/die qualora il peso corporeo del paziente fosse inferiore ai 50 kg, seguiti da terapia orale con CYF e prednisone per tre mesi. Il prednisone è stato somministrato al dosaggio di 1 mg/kg/die per 10-15 giorni, poi ridotto a 0,7 mg/kg/die per altre due settimane ed infine portato a 0,5 mg/kg/die e mantenuto a tale dose sino al termine del periodo d'induzione (tre mesi). Contemporaneamente la CYF veniva somministrata per via orale al dosaggio di 1-2 mg/kg/die nell'arco di tutta la fase induttiva.

Per la prevenzione della gonatotossicità, le donne in età fertile sono state trattate con analoghi de GnRH e i maschi hanno eseguito la crioconservazione del liquido seminale.

### ***Terapia di mantenimento della remissione***

Dopo la fase d'induzione i pazienti sono stati sottoposti a terapia di mantenimento della remissione. Durante il mantenimento i pazienti

continuavano ad assumere prednisone per os la cui dose veniva progressivamente ridotta fino a 0,2 mg/kg/die nel corso dei primi sei mesi e, successivamente, ulteriormente ridotta fino alla sospensione se i livelli di creatinina sierica risultavano normali e la proteinuria era stabilmente <0,5 g/die.

Nei pazienti che hanno assunto la terapia standard l'AZA è stata somministrata per via orale al dosaggio iniziale di 2 mg/kg/die e successivamente ridotta, se le condizioni del paziente lo consentivano, a 1,5 mg/kg/die. La CYA è stata somministrata inizialmente alla dose di 4 mg/kg/die per via orale. Dopo quattro settimane il dosaggio del farmaco veniva ridotto di 0,5 mg/kg/die ogni due settimane sino a raggiungere una dose di mantenimento pari a 2,5-3,0 mg/kg/die se il valore della proteinuria si assestava sotto 1 g/die.

Nel caso di riscontro di una conta leucocitaria inferiore ai 4.000/mm<sup>3</sup> la dose di AZA veniva dimezzata ed il trattamento veniva sospeso per due settimane se i valori si riducevano al di sotto dei 3.000/mm<sup>3</sup>. In caso di neutropenia, persistente o ricorrente, con valori inferiori a 1.000/mm<sup>3</sup> la terapia veniva sospesa definitivamente. Se nel corso del mantenimento i livelli sierici di creatinina aumentavano rispetto al *baseline* del 30%, in assenza di riacutizzazione della malattia, il dosaggio della CYA veniva ridotto del 25-50%. Tale riduzione veniva applicata anche nel caso di livelli sierici di potassio maggiori di 6 mEq/l, di valore raddoppiato degli enzimi epatici, o ipertensione refrattaria alla terapia convenzionale. Qualora tutti questi indici non si fossero normalizzati entro 2 settimane, la terapia con CYA veniva definitivamente sospesa.

Il gruppo di pazienti trattato con il MMF ha assunto un dosaggio iniziale di 2 g/die per i primi sei mesi, in seguito, la dose veniva

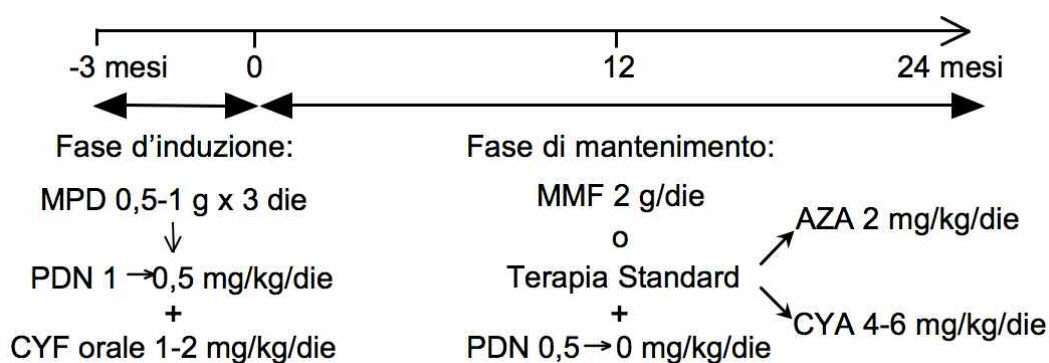
ridotta prima a 1,5 g/die e successivamente a 1 g/die se la proteinuria delle 24/h si presentava inferiore a 0,5 g/die, (Figura 4).

Nel caso di riscontro di una conta leucocitaria inferiore ai 4.000/mm<sup>3</sup> la dose di MMF veniva dimezzata. Il trattamento veniva sospeso per due settimane se i valori si riducevano al di sotto dei 3.000/mm<sup>3</sup>. Se i valori non aumentavano oltre i 4000/ mm<sup>3</sup> dopo questo periodo di sospensione la terapia veniva definitivamente interrotta. In caso di neutropenia, persistente o ricorrente, con valori inferiori a 1.000/mm<sup>3</sup> la terapia veniva sospesa definitivamente.

In caso di diarrea la dose di MMF poteva essere frazionata in tre somministrazioni giornaliere oppure, se non sufficiente, ridotta del 50%. Era ammesso anche l'uso di inibitori della pompa protonica. Se il disturbo persisteva e non era tollerato dal paziente il trattamento veniva definitivamente interrotto.

In ogni caso non erano ammesse interruzioni di trattamento per entrambi i gruppi, superiori ai 14 gg anche non continuativi.

Le infezioni venivano considerate gravi se richiedevano ricovero ospedaliero e terapia antibiotica endovena. In tal caso l'immunosoppressore veniva sospeso e, se era richiesta una sospensione > 14 gg il trattamento definitivamente interrotto.



**Figura 4. Disegno dello studio.**

## **Follow-up**

I pazienti sono stati seguiti durante la fase d'induzione della remissione con controlli clinici e bioumorali a cadenza mensile e con controlli trimestrali durante il periodo di mantenimento.

Ad ogni controllo venivano eseguiti i seguenti esami bioumorali: emocromo completo con formula leucocitaria, protidogramma, VES, PCR, C3, C4, AST, ALT, urea, creatinina, esame urine e proteinuria delle 24 ore. Il dosaggio degli anticorpi antinucleo ed antinucleo specifici veniva eseguito allo screening, al *baseline* e successivamente ogni 12 mesi o più frequentemente in caso di riacutizzazione.

Ad ogni valutazione clinica i pazienti erano sottoposti a visita medica completa con misurazione della pressione arteriosa. Veniva inoltre eseguito calcolo dell'indice di attività della malattia, utilizzando il punteggio ECLAM, e del dosaggio cumulativo di prednisone orale assunto nei tre mesi precedenti.

## **End points primari**

Per valutare l'efficacia della terapia di mantenimento è stata considerata la sopravvivenza senza riacutizzazione della GN.

## **End points secondari**

Gli end points secondari erano la comparsa e la frequenza di effetti collaterali, la necessità di sospendere definitivamente il trattamento a causa di questi e la frequenza di comparsa di insufficienze renale terminale che richiedesse trattamento emodialitico.

## **Definizione di riacutizzazione**

La riacutizzazione della GN è stata definita sulla base dei seguenti criteri:

- Aumento della proteinuria delle 24 ore di 2 *g/die*, se il valore precedente era inferiore a 3,5 *g/die*, oppure raddoppio della proteinuria qualora il valore precedente eccedesse i 3,5 *g/die*;
- Aumento della creatinina sierica superiore al 30% del valore al *baseline* associato ad almeno un segno di riacutizzazione del LES: aumento della proteinuria, sedimento urinario attivo, riduzione del C3 e C4 rispetto ai valori precedenti, aumento del titolo dell'anti-DNA nativo, segni di interessamento extra-renale della malattia lupica.

### **Analisi statistica**

Le variabili continue sono state considerate come valore medio  $\pm$  deviazione standard (DS). Le differenze tra i gruppi sono state valutate con il *test T di Student* per la distribuzione normale delle variabili.

Per analizzare le variazioni di alcuni parametri clinici e bioumorali, quali il punteggio ECLAM, la proteinuria, la creatininemia, la pressione arteriosa sistolica e diastolica, abbiamo utilizzato l'analisi della varianza per misure ripetute per dati non parametrici (ANOVA) applicando anche il test dei contrasti.

L'analisi statistica univariata della sopravvivenza è stata condotta con la curva di Kaplan-Meier. È stata considerata come data di d'ingresso nello studio il momento in cui il paziente aveva iniziato la terapia di mantenimento e come uscita la data della riacutizzazione o dell'ultimo controllo.

Tutte le analisi sono state eseguite con il pacchetto SPSS.



## RISULTATI

Un totale di 70 pazienti sono stati inclusi nello screening, il rapporto F/M era 61/9, l'età media 34,7 anni (range 17-58) e la durata media di malattia  $94 \pm 84$  mesi (range 1-300) (Tabella II).

Il gruppo A includeva 30 pazienti che avevano assunto la terapia standard (AZA o CYA) ed il gruppo B includeva 40 pazienti che avevano assunto il MMF.

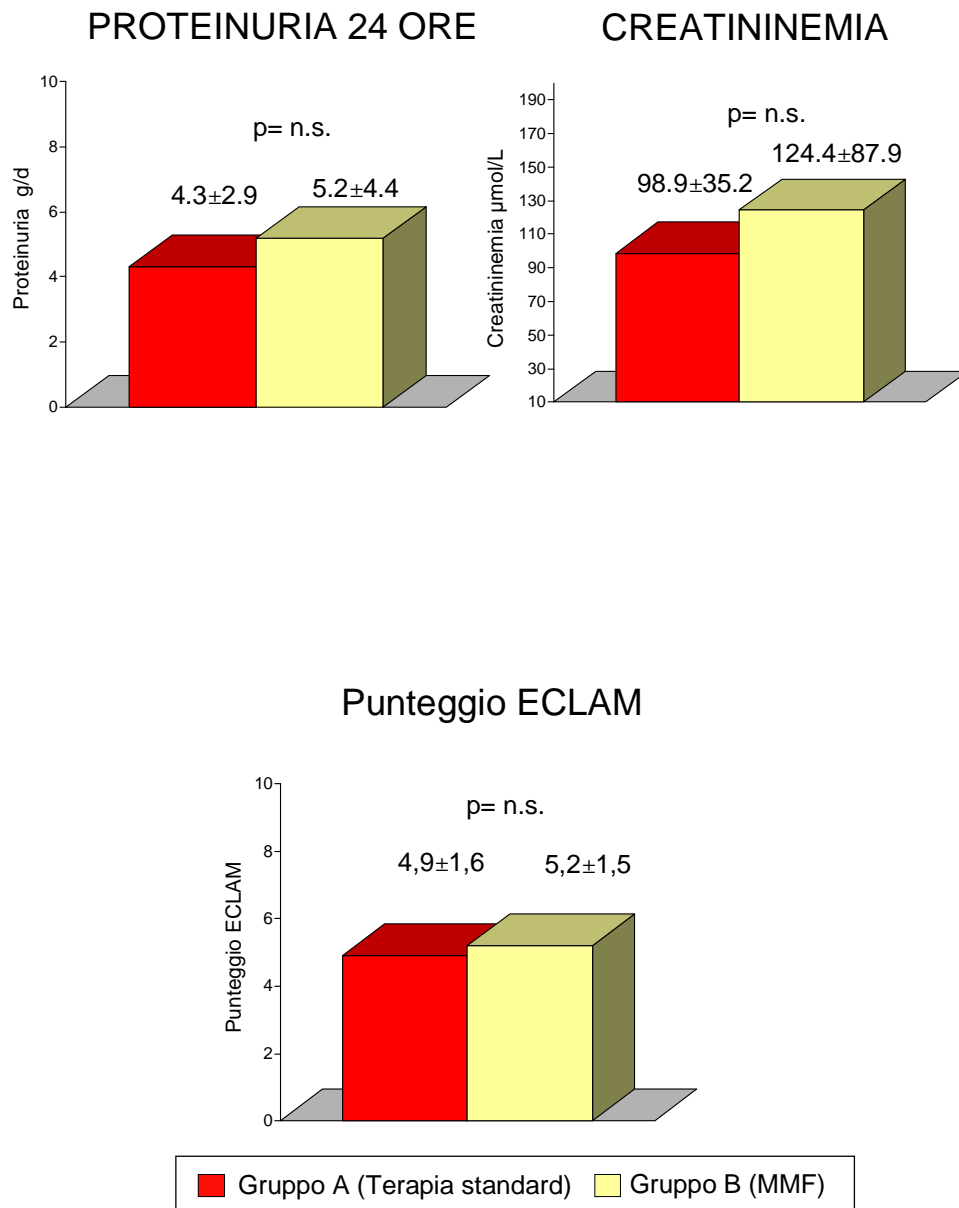
### Caratteristiche dei pazienti allo screening

I principali dati demografici non differivano tra i due gruppi di trattamento (Tabella II). I pazienti del gruppo A avevano un'età media di 34,7 anni, una durata media di malattia di  $77 \pm 78$  mesi; quelli del gruppo B avevano un'età media di 34,7 anni e una durata media di malattia di  $108 \pm 90$  mesi.

	Totale pazienti	GRUPPO A: Tx standard	GRUPPO B: MMF	p
Numero pazienti	70	30	40	
Rapporto F:M	61/9			
Età (anni)				
Media	34,7	34,7	34,7	n.s.
Range	17-58	17-58	18-56	
Durata della malattia (mesi)				
Mesi $\pm$ SD	$94 \pm 84$	$77 \pm 78$	$108 \pm 90$	n.s.
Range	1-300	1-300	1-300	

**Tabella II. Caratteristiche demografiche dei pazienti inclusi allo screening.**

Allo screening gruppo A avevano una proteinuria media delle 24 ore di  $4,3 \pm 2,9$  g/die ed i pazienti del gruppo B di  $5,2 \pm 4,4$  g/die (p=n.s.). La creatininemia nel gruppo A era  $98,9 \pm 35,2$   $\mu\text{mol/l}$ , nel gruppo B  $124,4 \pm 87,9$   $\mu\text{mol/l}$  (p=n.s.). L'indice ECLAM prima della terapia era  $4,9 \pm 1,6$  nel gruppo A e  $5,2 \pm 1,5$  nel gruppo B (p=n.s.). Nella Figura 4 si possono osservare i valori medi di proteinuria delle 24 ore, creatininemia, punteggio ECLAM nei pazienti del gruppo A (terapia standard) e del gruppo B (MMF) allo screening.



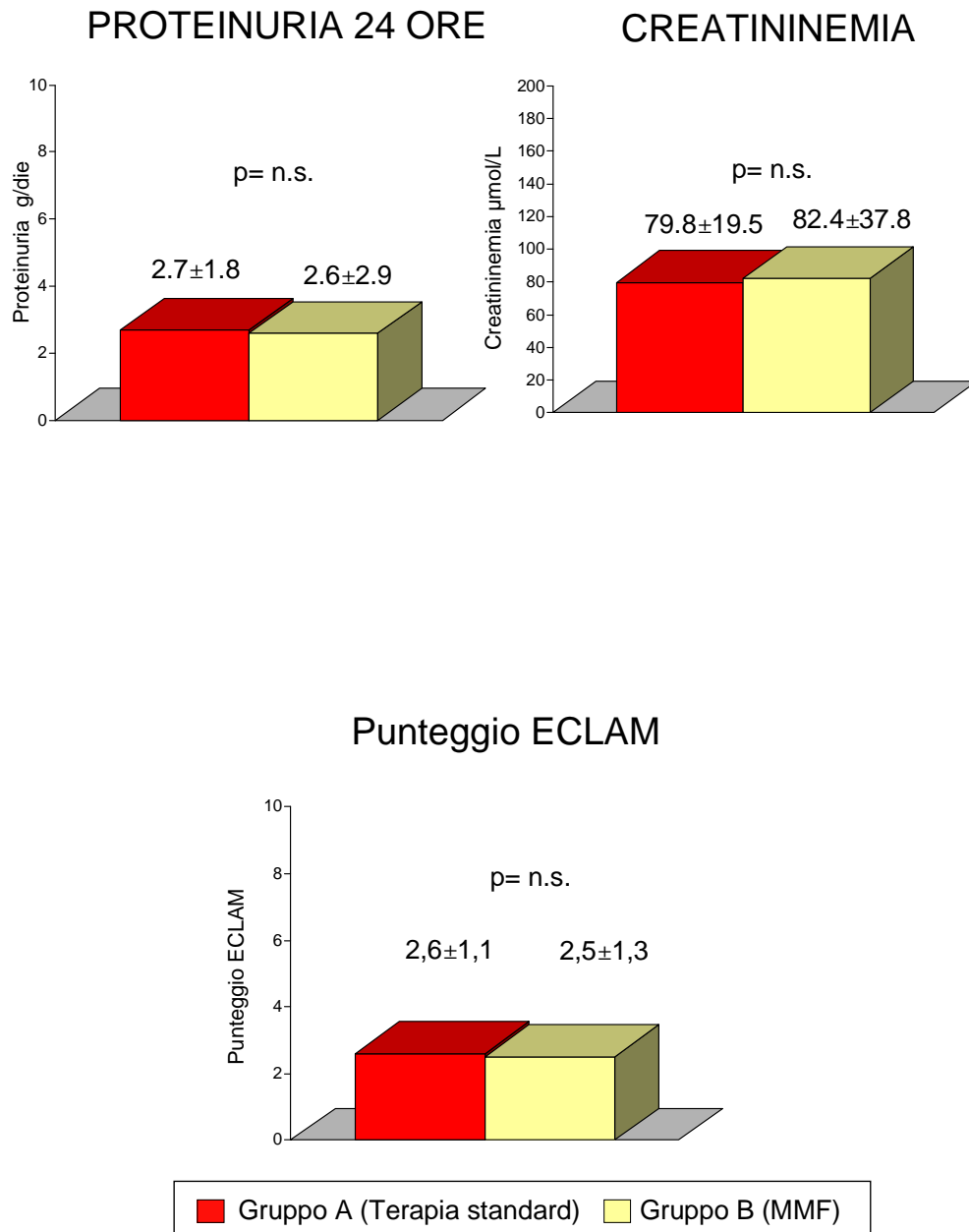
**Figura 4. Principali parametri di valutazione della GN lupica allo screening**

### **Caratteristiche dei pazienti al *baseline***

Al *baseline* i pazienti del gruppo A avevano una proteinuria media delle 24 ore di  $2,7 \pm 1,8$  g/die e il gruppo B di  $2,6 \pm 2,9$  g/die (p=n.s.).

La creatininemia nel gruppo A era  $79,8 \pm 19,5$   $\mu\text{mol/l}$  e nel gruppo B  $82,4 \pm 37,8$   $\mu\text{mol/l}$  (p=n.s.) (Figura 5). L'indice di attività della malattia: ECLAM era  $2,6 \pm 1,1$  nel gruppo A e  $2,5 \pm 1,3$  nel gruppo B (p=n.s.) (Figura 5).

Nella Figura 5 sono riportati i valori di proteinuria delle 24 ore, creatininemia, ed il punteggio ECLAM al *baseline* nei pazienti del gruppo A (terapia standard) confrontati con quelli del gruppo B (MMF).



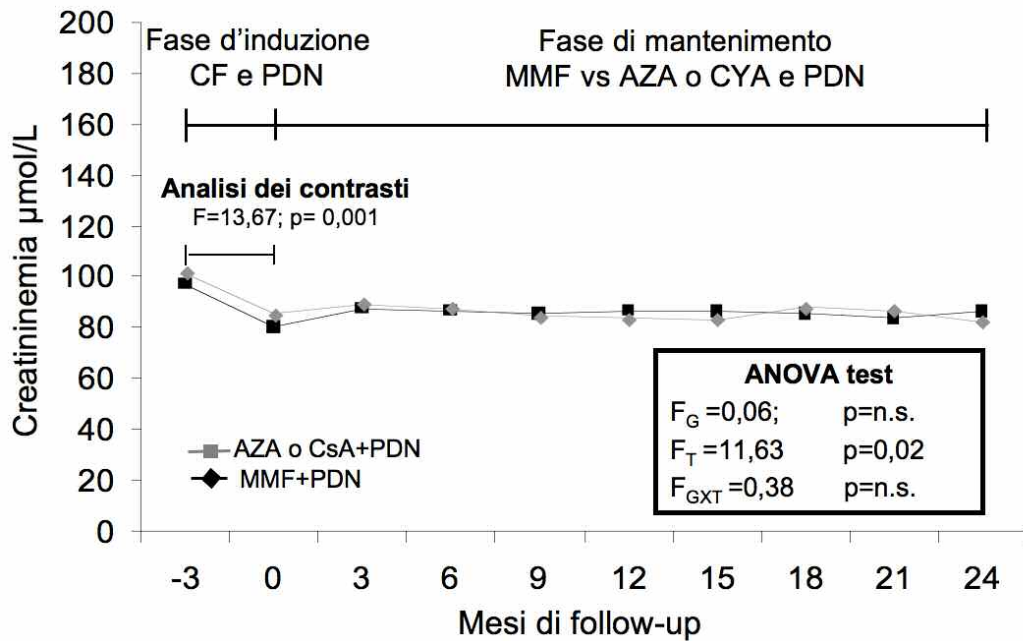
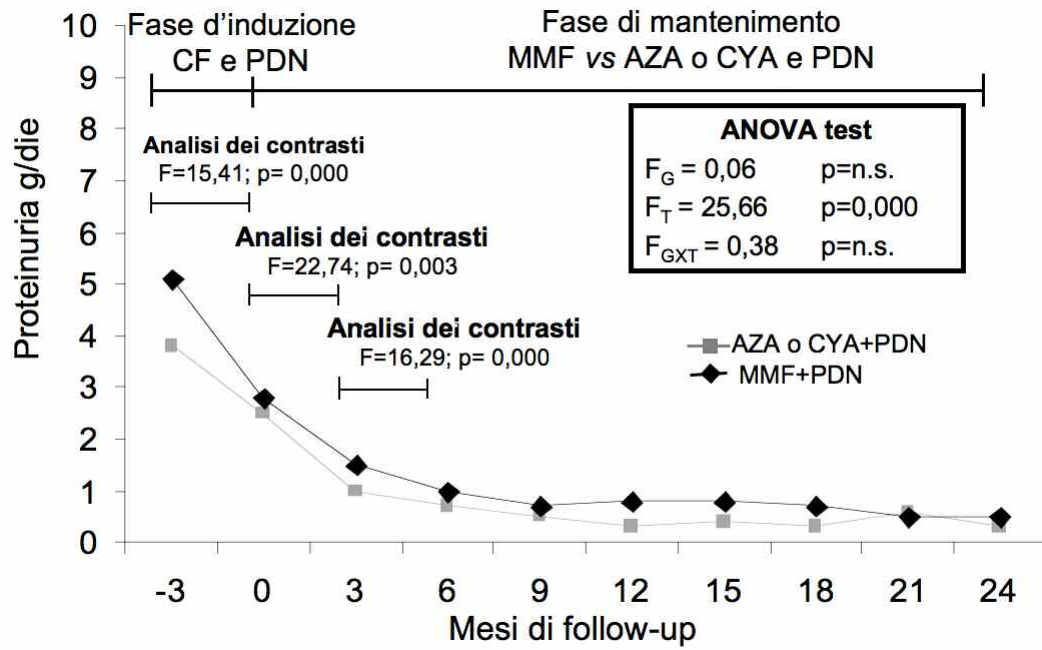
**Figura 5. Principali parametri di valutazione della GN lupica al *baseline*.**

### **Variazione dei parametri di valutazione della GN lupica**

Nel corso del *follow up* (fase d'induzione e mantenimento) in entrambi i gruppi vi è stata una significativa riduzione dei valori di proteinuria delle 24 ore ( $F_T=25,66$ ;  $p=0,000$ ), creatinenemia ( $F_T=11,63$ ;  $p=0,02$ ) ed indice ECLAM ( $F_T=14,82$ ;  $p=0,000$ ). La riduzione della proteinuria delle 24 ore era particolarmente evidente durante i primi sei mesi di trattamento (Figura 6).

Abbiamo inoltre osservato una riduzione significativa della pressione sistolica ( $F_T=3,02$ ;  $p=0,022$ ) ma non di quella diastolica ( $F_T=1,54$ ;  $p=n.s.$ ).

Non abbiamo osservato differenze significative tra i 2 gruppi di trattamento nella riduzione di proteinuria delle 24 ore ( $F_G=0,06$ ;  $p=n.s.$ ), creatininemia ( $F_G=0,36$ ;  $p=n.s.$ ) (Figura 6), pressione sistolica ( $F_G=0,539$ ;  $p=n.s.$ ) e diastolica ( $F_G=3,060$ ;  $p=n.s.$ ).



**Figura 6. Andamento della proteinuria delle 24 ore e creatininemia durante il follow up.**

## Riacutizzazione della GN

Dei 70 pazienti entrati nello studio tutti hanno portato regolarmente a termine la terapia di induzione.

Inoltre, nessun paziente è deceduto o ha sviluppato insufficienza renale terminale durante il periodo di *follow up*.

La sopravvivenza senza riacutizzazione renale durante il periodo di mantenimento è risultata simile nei due gruppi: 82% a 24 mesi per il gruppo A, 88% a 24 mesi per il gruppo B, 68% a 54 mesi in entrambi i gruppi (Figura 7). Confrontando le curve di sopravvivenza tra i due gruppi non sono emerse differenze significative.

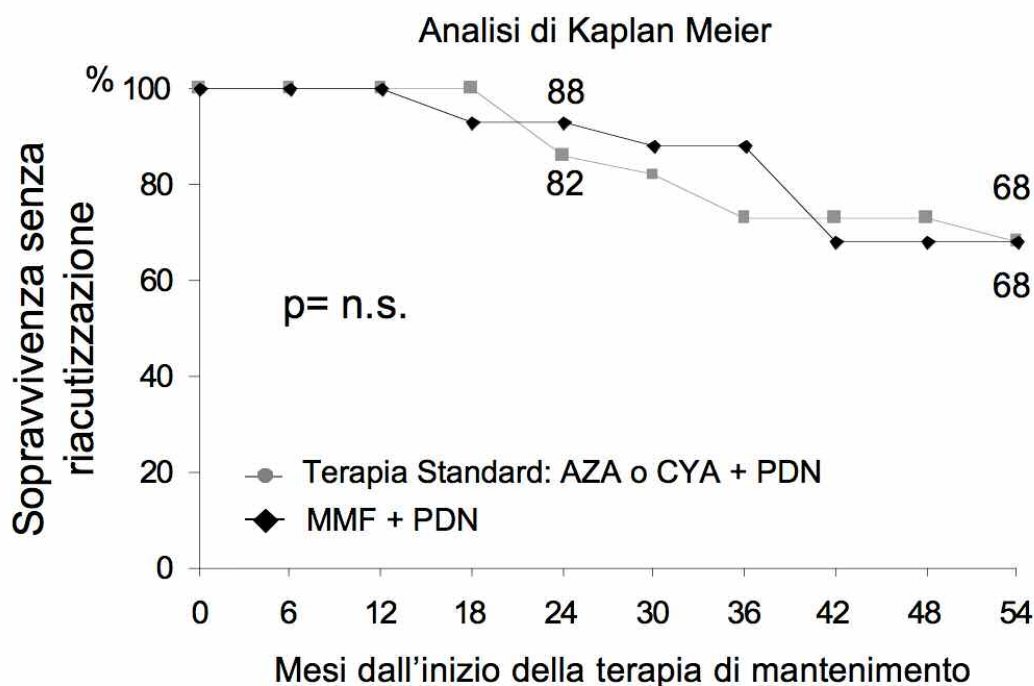


Figura 7. Andamento della sopravvivenza nei due gruppi di pazienti durante il *follow up*.



### **Effetti collaterali**

Gli eventi avversi osservati nei pazienti che assumevano AZA o CYA (gruppo A) sono stati: amenorrea in due casi (7%), infezioni di lieve entità in 11 casi (37%), neuropatia periferica in un caso (3%), iperplasia gengivale in due (7%), disordini gastrointestinali in un caso (3%). Si trattava di eventi di lieve entità generalmente ben controllabili e che non hanno richiesto sospensione del trattamento. Otto (27%) pazienti hanno avuto effetti collaterali di entità tale da necessitare la sospensione della terapia. Si è trattato di leucopenia severa in 3 pazienti (10%), crisi ipertensiva in due pazienti (7%) e infezioni severe in 3 pazienti (10%).

Gli effetti collaterali osservati nei pazienti del gruppo B (MMF) sono stati: disturbi gastrointestinali in 4 casi (10%); diarrea in 3 (8%); infezioni severe in due (5%); infezioni lievi in 15 (37%); amenorrea in 3 (7%). La sospensione del trattamento è stata necessaria in 3 casi (7%): un paziente con disturbi intestinali, uno con diarrea ed uno con infezione severa (Tabella III).

Le frequenze dei singoli eventi avversi non sono risultate significativamente diverse nei due gruppi di pazienti.

Confrontando, invece, la frequenza di sospensione del trattamento nel gruppo A (terapia *standard*) e nel gruppo B (MMF) si è osservato che il numero di pazienti che hanno dovuto sospendere la terapia per comparsa di effetti collaterali era maggiore nel gruppo A rispetto al gruppo B (27% vs 7%,  $p < 0,05$ ).

	GRUPPO A Terapia standard	GRUPPO B MMF	p
Leucopenia	3* (10%)	0 (0%)	n.s.
Amenorrea	2 (7%)	3 (7%)	n.s.
Crisi ipertensive	2* (7%)	0 (0%)	n.s.
Neuropatia periferica	1 (3%)	0 (0%)	n.s.
Iperplasia gengivale	2 (7%)	0 (0%)	n.s.
Infezioni severe	3* (10%)	2 (1*) (5%)	n.s.
Infezioni lievi	11 (37%)	15 (37%)	n.s.
Altri	2 (7%)	3 (7%)	n.s.
Diarrea	0 (0%)	3 (1*) (7%)	n.s.
Disordini gastrointestinali	1 (3%)	4 (1*) (10%)	n.s.
*Necessità d'interrompere il trattamento	8 (27%)	3 (7%)	<0.05

**Tabella III. Effetti indesiderati riscontrati durante lo studio.**

## **DISCUSSIONE E CONCLUSIONI**

Il lupus eritematoso sistemico è una malattia rara. La GN colpisce circa il 50% dei pazienti con LES, per cui i pazienti con glomerulonefrite sono pochi. L'esiguo numero di pazienti rende difficile condurre studi che abbiano sufficiente potere statistico per poter trarre delle conclusioni definitive. La maggior parte degli studi clinici che sono stati finora condotti spesso non hanno raggiunto un campione statisticamente adeguato. Inevitabilmente non basta un singolo Centro per reclutare un campione numericamente sufficiente, ma si deve ricorrere a studi multicentrici, che coinvolgano più centri a livello nazionale, continentale o addirittura mondiale.

E' anche in quest'ottica che, per raggiungere una numerosità adeguata abbiamo condotto il nostro studio in collaborazione con i Centri di Pisa e di Milano raggiungendo un campione di 70 pazienti. Si fa presente che la maggior parte degli studi pubblicati negli anni passati su riviste internazionali avevano casistiche di numerosità inferiore alla nostra (106,111-113).

D'altra parte la maggior parte degli studi principali finora pubblicati si occupa della terapia di induzione della GN lupica, ove il MMF viene confrontato con la CYF (106,111-113), considerata come terapia di riferimento sulla base degli studi condotti dall'NIH (77,79,80,134). Al contrario, è stato pubblicato un unico studio sulla terapia di mantenimento (130) con MMF. Si tratta però di uno studio condotto su una casistica limitata.

Si può quindi affermare che se nella terapia di induzione il ruolo del MMF sta emergendo perchè suffragato da vari studi che ne dimostrano un'efficacia pari se non superiore alla CYF, non vi sono dati sufficienti per poter esprimere un giudizio su questo farmaco

quando utilizzato nella terapia di mantenimento. Il nostro studio mirava a poter dare un contributo in questo senso.

Nella pratica clinica corrente i farmaci immunosoppressori comunemente utilizzati nella terapia di mantenimento della GN lupica sono l'AZA e la CYA (74).

Questi sono stati da noi considerati come equivalenti sulla base di un recente studio randomizzato in cui questi due farmaci sono stati confrontati nella terapia di mantenimento. Questo studio ha dimostrato come AZA e CYA siano ben tollerati ed egualmente efficaci nel prevenire le riacutizzazioni della GN lupica (135).

In questo studio abbiamo confrontato l'efficacia e la tossicità del MMF nella terapia di mantenimento della remissione della GN proliferativa *versus* una terapia *standard* basata appunto sull'impiego di AZA o CYA. Dopo una fase d'induzione condotta con corticosteroidi e CYF per via orale, un gruppo di 32 pazienti aveva assunto terapia con AZA o CYA ed un altro gruppo di 46 pazienti aveva assunto terapia con MMF.

Prima della terapia di induzione ed al momento del *baseline* non vi erano differenze significative tra i due gruppi per quanto riguarda la classe istologica della GN, i parametri demografici e gli indici clinci presi in considerazione.

Abbiamo osservato che la riduzione della proteinuria delle 24 ore durante la terapia di induzione, legato alla CYF, proseguiva anche durante successivi tre mesi. Riteniamo che questo fenomeno sia dovuto all'effetto "carry over" della CYF, peraltro riportato anche negli studi dell'NIH. Successivamente non abbiamo osservato ulteriori variazioni dei valori di proteinuria 24 ore durante il corso del *follow up*. E' importante segnalare che la curva di andamento dei principali parametri considerati nello studio, sia durante la terapia di induzione

che durante la terapia di mantenimento erano sovrapponibili nei due gruppi di trattamento.

Anche la curva di sopravvivenza senza riacutizzazione renale è risultata sovrapponibile nei pazienti trattati con i due diversi schemi terapeutici.

Questi dati ci hanno indotto a concludere che il MMF sembra avere un'efficacia simile alla terapia standard, a base di AZA o CYA, nella terapia di mantenimento della remissione della GN proliferativa in corso di LES.

Analizzando gli eventi avversi, come riportato in Tabella III le frequenze dei singoli eventi non sono risultate significativamente diverse. Si tratta tuttavia di farmaci che hanno mostrato effetti collaterali di diversa natura. Si è infatti notato una maggior frequenza di disturbi gastrointestinali nei pazienti che avevano assunto MMF e di eventi avversi ematologici e comparsa di ipertensione nei pazienti che avevano assunto la terapia standard. La frequenza globale di infezioni resta di discreta entità (oltre il 30%) in entrambi i gruppi di trattamento, si è trattato per la maggior parte di forme lievi che non hanno richiesto la sospensione definitiva del trattamento, ma solo un aggiustamento della dose, terapia antibiotica orale oppure sospensione solo temporanea del trattamento.

Se però si va ad analizzare il numero di pazienti che hanno dovuto sospendere il trattamento a causa degli effetti collaterali si osserva che i pazienti sottoposti a trattamento standard hanno dovuto sospendere la cura in percentuale maggiore rispetto ai pazienti in trattamento con MMF (Tabella III).

La sospensione del trattamento a causa degli effetti collaterali è un parametro per valutare la gravità di questi. Per questo motivo

riteniamo che i pazienti in terapia con MMF abbiano sofferto di effetti collaterali di minor gravità rispetto ai pazienti sotto terapia standard.

Pertanto possiamo concludere che nella terapia di mantenimento della remissione della GN proliferativa diffusa, il MMF sembra avere un'efficacia simile alla terapia convenzionale con AZA o CYA, ma può essere considerato più sicuro e meglio tollerato.

Il MMF si è dimostrato una valida alternativa, efficace e sicura, nella terapia di mantenimento della GN lupica.

Saranno necessari ulteriori studi, controllati e soprattutto randomizzati, per confermare queste conclusioni.

## BIBLIOGRAFIA

1. Doria A, Iaccarino L, Ghirardello A et al. Long-term prognosis and causes of death in systemic lupus erythematosus. *Am J Med* 2006. 119: 700-6.
2. ACR ad hoc Committee on SLE guideline. *Arthritis Rheum* 1999. 42: 1785-96.
3. Todesco S, Doria A, Bernardi C, Ghirardello A, Corbanese S, Gianese G, Iaccarino L, Della Libera S, Gambari PF. Sopravvivenza, cause di morte e fattori prognostici nel LES: studio su una coorte di 338 pazienti seguiti in un unico centro reumatologico. *Sem Clin Immunol* 1999. 17: 73.
4. Ghirardello A, Doria A, Gambari PF. Autoanticorpi ed autoantigeni nel lupus eritematoso sistemico. Studio mediante l'immunoblotting. *Reumatismo* 1994. 46(4): 208-15.
5. Rosen A, Casciola-Rosen L, Ahearn J. Novel packages of viral and self-antigens are generated during apoptosis. *J Exp Med* 1995. 181: 1557-61.
6. Utz PJ, Anderson P. Posttranslational protein modification, apoptosis, and the bypass of tolerance to autoantigens. *Arthritis Rheum* 1998. 41: 1152-60.
7. Utz PJ, Hottel M, Schur PH, Anderson P. Proteins phosphorylated during stress-induced apoptosis are common targets for autoantibody production in patients with systemic lupus erythematosus. *J Exp Med* 1997. 185: 843-54.

8. Perniok A, Wedeking K, Herrmann M, Specker C, Schneider M. High levels of circulating early apoptotic peripheral blood mononuclear cells in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 1998. 7: 113-8.
9. Herrmann M, Voll RE, Zoller OM, Hagenhofer M, Ponner BB, Kalden JR. Impaired phagocytosis of apoptotic cell material by monocyte-derived macrophages from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1998. 41: 1241-50.
10. Furnier G. Circulation of DNA and lupus nephritis. *Kidney Int* 1988. 33: 487-97.
11. Madaio MP. The role of autoantibodies in the pathogenesis of lupus nephritis. *Seminars in Nephrology* 1999. 19: 48-56.
12. Foster MH, Kelley VR. Lupus nephritis: update on pathogenesis and disease mechanism. *Seminars in Nephrology* 1999. 19: 173-181.
13. Ghirardello A, Doria A, Villalta D, Zampieri S, Tozzoli R, Gambari PF. Gli anticorpi antinucleosomi: nuovo marker sierologico di lupus eritematoso sistemico. *Reumatismo* 2000. 52: 242-248.
14. Amoura Z, Chabre H, Bach J, Koutouzov S. Antinucleosome antibodies and systemic lupus erythematosus. *Adv nephrol* 1997. 26: 303-16.
15. Schiedeke T, Stockli FW, Weber R, Suigiaki Y, Batsford SR, Voat A. Histones have high affinity for the glomerular basement membrane. *J Exp Med*. 1989. 1879-94.



16. Batsford SR. Cationic antigens as mediators of inflammation. *Apmis* 1991. 99: 1-9.
17. Vogt A, Batsford S, Morioka T. Nephritogenic antibodies in lupus nephritis. *Tohoku J Exp Med* 1994. 45: 273-9.
18. Kramers C, Hylkema MN, van Bruggen MCJ, van de Lagemaat R, Dijkman HBPM, Assmann KJM, Smeenk RJT, Berden JH. Anti-nucleosome antibodies complexed to nucleosomal antigens show anti-DNA reactivity and bind to rat glomerular basement membrane in vivo. *J Clin Invest* 1994. 94: 568-577.
19. van Bruggen MCJ, Walgreen B, Rijke TP, Tamboer W, Kramers C, Smeenk RJT, Monestier M, Fournie GJ, Berden JH. Antigen specificity of antinuclear antibodies complexed to nucleosomes determines glomerular basement membrane binding in vivo. *Eur J Immunol* 1997. 27: 1564-9.
20. Amoura Z, Koutouzov S, Chabre H, Cacoub P, Amoura I, Musset L, Bach JF, Piette JC. Presence of antinucleosome autoantibodies in a restricted set of connective tissue diseases. Antinucleosome antibodies of the IgG3 subclass are markers of renal pathogenicity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2000. 43: 76-84.
21. Doria A, Villalta D, Ghirardello A, Tozzoli R, Bizzaro N, Zampieri S, Gambari GF. Antinucleosome antibodies in SLE: A 2-year follow-up study of 101 patients. *Arthritis Rheum* 2000. 43: S244.

22. Yanase K, Smith RM, Puccetti A, Jarret L, Madaio MP. Receptor-mediated cellular entry of nuclear localizing anti-DNA antibodies via myosin I. *Clin Invest* 1997. 100: 25-31.
23. Mooskeker MS, Cheney RE. Unconventional myosins. *Anu Rev Dev Biol* 1995. 11: 633-75.
24. Geli MI, Riezman H. Role of type 1 myosins in receptor mediated endocytosis in yeast. *Science* 1996. 272: 533-5.
25. Oberhammer F, Wilson JW, Dive C, Morris ID, Hickman JA, Wakeling AE, Walker PR. Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or 500 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation. *EMBO* 1993. 12: 3679-84.
26. Cohen GM, SunX-M, Snowden RT, Dinsdale D, Skilleter DN. Key morphologic features of apoptosis may occur in the absence of internucleosomal DNA fragmentation. *Biochem J* 1992. 286: 331-4.
27. Peithsch M, Polzar B, Stephan H, Crompton T, MacDonald HR, Mannherz HG, Tschopp J. Characterization of endogenous deoxyribonuclease involved in nuclear DNA degradation during apoptosis. *EMBO* 1993. 12: 371-7.
28. Kroemer G, Petit P, Zamzami N, Vayssiere JL, Mignotte B. The biochemistry of programmed cell death. *FASEB* 1995. 9: 1277-87.
29. Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 1995. 267: 1445-9.

30. Pasquariello A, Morriconi L, Paleologo G, Mosca M, Moneta I, Bombardieri S, Ossi E, Conte E, Antonello A, Gambari PF, Doria A. The prognostic relevance of immunohistological findings in renal biopsy in systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol* 1996. 14 (S16): 49.
31. Grande JP, Balow JE. Renal biopsy in lupus nephritis. *Lupus* 1998. 7: 611-7.
32. Iaccarino L, Doria A, Vescovi F, Ghirardello A, Gianese G, Della Libera S, Gambari PF. La glomerulonefrite lupica: studio su una casistica di 70 biopsie renali. *Progressi in reumatologia* 2000. 1: 9 (IV Congresso Italiano dei Reumatologi ospedalieri).
33. Churg J, Bernstein J, Glassock RJ. Lupus nephritis. In: *Renal disease: Classification and atlas of glomerular disease*, 2nd edn. Igaku-Shoin: New York, 1995. 151-179.
34. Mc Cluskey R. *Lupus nephritis: kidney pathology*. New York: appleton-Century-Crofts, 1975. 456-59.
35. Doria A, Iaccarino L, Ghirardello A, Vescovi F, Gianese G, Della Libera S, Gambari PF. La glomerulonefrite lupica. *Progressi in Reumatologia* 2000.1: 69-71.
36. Weening JJ, D'Agati VD, Schwartz MM et al. The classification of glomerulonephritis in SLE. *J Am Soc Nephrol* 15: 241-250, 2004.

37. Appel GB, Silva F, Pirani C, Meltzer J, Estes D. Renal involvement in systemic lupus erythematosus. *Medicine* 1978. 57: 371-410.
38. Baldwin DS, Gluck MG, Lowenstein MJ, Gallo GR. Lupus nephritis: clinical causes as related to morphological forms and their transitions. *Am J Med* 1977. 62: 12-30.
39. Banfi G, Mazzucco G, Dibelgoioso GB, Barbiano G, Bosiso M, Strata P, Confalonieri R, Ferrario F, Imbasciati E, Monga G. Morphological parameters in lupus nephritis: their relevance for classification and relationship with clinical and histological findings and outcome. *Q J Med* 1985. 217: 153-68.
40. Hect B, Siegel N, Adler M, Kashgarian M, Hayslett JP. Prognostic indices in lupus nephritis. *Medicine* 1976. 55: 163-81.
41. Appel GB, Valeri A. The course and the treatment of lupus nephritis. *Annu Rev Med* 1994. 45: 525-537.
42. Appel GB, Pirani CL, D'Agati V. Renal vascular complication of systemic lupus erythematosus (editorial). *J Am Soc Nephrol* 1994. 4:1499-515.
43. Morel-Maroger L, Mery JP, Droz D, Godin M, Verroust P, Koorilsky O, Richet G. The course of lupus nephritis: contribution of serial renal biopsies. *Adv nephrol* 1976. 6: 79-118.
44. Farrugia E, Torres VE, Gastineau D, Michet CJ, Holley KE. Lupus anticoagulant in systemic lupus erythematosus:

a clinical and renal pathological study. *Am Kidney Dis* 1992. 20: 463-71.

45. Frampton G, Perry GJ, Chan TM, Cameron JS. Significance of anticardiolipin and antiendothelial cell antibodies in the nephritis of lupus. *Contribut Nephrol* 1992. 99: 7-16.
46. Frampton G, Hicks J, Cameron JS. Significance of antiphospholipid antibodies in patients with lupus nephritis. *Kidney Int* 1991. 39: 1225-31.
47. Hugson MD, Nadasdy T, McCarty GA, Sholer C, Min KW, Silva F. Renal thrombotic microangiopathy in patients with systemic lupus erythematosus and the antiphospholipid syndrome. *Am J Kidney Dis* 1992. 20: 150-86.
48. Asherson R, MacKorth-Young C, Harris E, Gharavi A, Huges G. Multiple venous and arterial thrombosis associated with the lupus anticoagulant and antibodies to cardiolipin in the absence of SLE. *Rheumatol Int* 1985. 5: 91.
49. Yamamoto T, Nagase M, Hishida A, Honda N. Interstitial inflammatory and chronic tubulointerstitial lesions in lupus nephritis: comparison with those in IgA nephropathy. *Lupus* 1993. 2: 261-8.
50. Hill GS, Delahousse M, Nocy D, Tomkiewicz E, Rémy P, Mignon F, Méry JP. A new morphologic index for the evaluation of renal biopsies in lupus nephritis. *Kidney Int* 2000. 58: 1160-73.

51. Doria A, Piccoli A, Vesco P, Vaccaro E, de Zambiasi P, Cozzi L, Gambari PF. Outcome in Systemic lupus erythematosus. *Lupus* 1993. 2: 408.
52. Doria A, Iaccarino L, Corbanese S, et al. La glomerulonefrite lupica: nuove acquisizioni su patogenesi, diagnosi e trattamento. *Progressi in Reumatologia* 2001. 2: 12-26.
53. Doria A, Gambari PF, Todesco S. Therapy of lupus nephritis: the main challenge in the management of severe systemic lupus erythematosus. in: K.A. Boki, A.A. Drosos, H.M. Moutsopoulos, A.G. Tzioufas, P.G Vlachoyiannopoulos. VII Mediterranean Congress of Rheumatology. Monduzzi ed., Bologna 1994. 157-62.
54. Austin HA III, Balow JE. Treatment of lupus nephritis. *Seminars in Nephrology* 2000. 20: 265-76.
55. Chan TM, Li F-K, Hao WK, Chan KW, Lui SL, Tang S, Lai KN. Treatment of membranous lupus nephritis with nephrotic syndrome by sequential immunosuppression. *Lupus* 1999. 8: 545-51.
56. Gordon C, Dostal C, Petera P, et al. EULAR trial of pulse cyclophosphamide followed by azathioprine in lupus nephritis. *Arthritis Rheum* 1999. 42:S167.
57. Chan TM, Li F-K, Hao WK, Chan KW, Lui SL, Tang S, Lai KN. Treatment of membranous lupus nephritis with nephrotic syndrome by sequential immunosuppression. *Lupus* 1999. 8: 545-51.

58. Moroni G, Maccario M, Banfi G, Quaglini S, Ponticelli C. Treatment of membranous lupus nephritis. *Am J Kidney Dis* 1998. 31: 681-6.
59. Hallegua D, Wallace DJ, Metzger AL, Rinaldi RZ, Klinenberg JR. Cyclosporine for lupus membranous nephritis: experience with ten patients and review of the literature. *Lupus* 2000. 9: 241-51.
60. Korbert SM, Lewis EJ, Schwartz MM, Reichlin M, Evans J, Rohde RD. Factors predictive of outcome in severe lupus nephritis. *Am J Kidney Dis* 2000. 35: 904-14.
61. Moroni G, Quaglini S, Maccario M, Banfi G, Ponticelli C. "Nephritis flares" are predictors of bad long-term renal outcome in lupus nephritis. *Kind Int* 1996. 50: 2047-2053.
62. Ponticelli C, Moroni G. Flares in lupus nephritis: incidence, impact on renal survival and management. *Lupus* 1998. 7: 635-8.
63. Gruppo italiano per lo studio della nefrite lupica (GISNEL): Lupus nephritis: prognostic factors and probability of maintaining life-supporting renal function 10 years after the diagnosis. *Am J Kidney Dis* 1992. 19: 473-479.
64. Dubois EL, Wierchowieski M, Cox MB et al: Duration and death in systemic lupus erythematosus: an analysis of 249 cases. *JAMA* 1974. 227: 1399.
65. Ginzler EM, Felson DT, Anthony JM, Anderson JJ: Hypertension increases the risk of renal deterioration in

Systemic Lupus Erythematosus. *J Rheumatol* 1993. 20: 1694-700.

66. CLark WF, Moist LM. Management of chronic renal insufficiency in lupus nephritis: role of proteinuria, hypertension and dyslipidemia in the progression of renal disease. *Lupus* 1998. 7: 649-51.
67. Kimberly RP, Lockshin MD, Sherman RL, Beary JF, Mouradian J, Cheigh JS. "End-stage" lupus nephritis: Clinical course to and outcome on dialysis. Experience with 39 patients. *Am J Med* 1981. 60: 277-87.
68. Coplon NS, Diskin CJ, Petersen J, Swenson RS. The long-term clinical course of systemic lupus erythematosus in end stage renal disease. *N Engl J Med* 1983. 308: 186-90.
69. Ward MM. Access to renal transplantation among patients with end-stage renal disease due to lupus nephritis. *Am J Kid Dis* 2000. 35: 915-22.
70. Ward MM. Outcomes of renal transplantation among patients with end stage renal disease caused by lupus nephritis. *Kidney International* 2000. 57: 2136-43.
71. Mojcik CF, Klippel JH. End stage renal disease and systemic lupus erythematosus. *Am J Med* 1996. 101: 100-7.
72. BG.Katzung. *Farmacologia generale e clinica*. V edizione, Piccin
73. G.Bonadonna, G.Robustelli della Cura, P. Valagussa. *Medicina oncologica*. VII edizione, Masson



74. Boumpas DT, Austin HA III, Vaughn EM, Klippel JH, Steinberg AD, Yarboro CH, Balow JE. Controlled trial of pulse methylprednisolone versus two regimens of pulse cyclophosphamide in severe lupus nephritis. *Lancet* 1992. 340: 741-5.
75. Gourley MF, Austin HA, Scott D, Yarboro CH, Vaughan EM, Muir J, Boumpas DT, Klippel JH, Ballow JE, Steinberg AD. Methylprednisolone and Cyclophosphamide, alone or in combination, in patients with lupus nephritis. A randomized, A randomized, controlled trial. *Ann Int Med* 1996. 125: 549-57.
76. Ciruelo E, de la Cruz L, Lopez I, Gomez-Reino JJ. Cumulative rate of relapse of lupus nephritis after successful treatment with cyclophosphamide. *Arthritis Rheum* 1996. 39: 2028-34.
77. Ioannidis JP, Boki KA, Katsorida ME. Remission, relapse and remission of proliferative lupus nephritis treated with cyclophosphamide. *Kidney Int* 2000. 57: 258-64.
78. Dooley MA, Hogan S, Jennette C, Falk R. Cyclophosphamide therapy for lupus nephritis: poor renal survival in black Americans. Glomerular Disease Collaborative Network. *Kidney Int* 1997. 51: 1188-95.
79. BG.Katzung. *Farmacologia generale e clinica*. V edizione, Piccin
80. G.Bonadonna, G.Robustelli della Cura, P. Valagussa. *Medicina oncologica*. VII edizione, Masson

81. Tsokos GC. Immunomodulatory treatments in patients with rheumatic disease: mechanism of action. *Semin Arthritis Rheum* 1987. 17: 24-38.
82. Satoshi M, Koyasu S. Mechanisms of action of cyclosporine. *Immunopharmacol* 2000. 47: 119-125.
83. Su B, Jacinto E, Hibi M, Kallunki T, Karin M, Ben-Neriah Y. JNK is involved in signal integration during costimulation of T lymphocytes. *Cell* 1994. 77: 727-36.
84. Emmi L. Chiarini F. Strategie immunosoppressive nelle malattie autoimmuni e nel trapianto d'organo. Rosini Ed. 2002. Pag. 73-120.
85. G.Bonadonna, G.Robustelli della Cura, P. Valagussa. *Medicina oncologica*. VII edizione, Masso
86. BG.Katzung. *Farmacologia generale e clinica*. V edizione, Piccin
87. Allison AC, Eugui EM. Mycophenolate mofetil and its mechanisms of action. *Immunopharmacology* 2000. 47: 85-118.
88. Carr SF, E Papp, JC Wu and Y Natsumeda. Characterization of human type I and type II IMP dehydrogenases. *J Biol Chem* 1993. 268: 27286-90.
89. Glomsda BA, Blaheta RA, Hailer NP. Inhibition of monocyte/endothelial cell interactions and monocyte adhesion molecule expression by the immunosuppressant mycophenolate mofetil. *Spinal Cord* 2003. 41: 610-9.

90. Cohn RG, Mirkovich A, Dunlap B, Burton P, Chiu SH, Eugui E, Caulfield JP. Mycophenolic acid increases apoptosis, lysosomes and lipid droplets in human lymphoid and monocytic cell lines. *Transplantation* 1999. 68: 411-8.
91. Colic M, Stojic-Vukanic Z, Pavlovic B, Jandric D, Stefanoska I. Mycophenolate mofetil inhibits differentiation, maturation and allostimulatory function of human monocyte-derived dendritic cells. *Clin Exp Immunol* 2003. 134: 63-9.
92. Lagaraine C, Lebranchu Y. Effects of immunosuppressive drugs on dendritic cells and tolerance induction. *Transplantation* 2003. 75 (S8): 37-42.
93. Allison AC, Kowalski WJ, Muller CJ, Waters RV, Eugui EM. Mycophenolic acid and brequinar, inhibitors of purine and pyrimidine synthesis, block the glycosylation of adhesion molecules. *Transplant Proc* 1993. 25 (S2): 67-70.
94. Senda M, DeLustro B, Eugui E, Natsumeda Y. Mycophenolic acid, an inhibitor of IMP dehydrogenase that is also an immunosuppressive agent, suppresses the cytokine-induced nitric oxide production in mouse and rat vascular endothelial cells. *Transplantation* 1995. 60: 1143-8.
95. Shoenfeld Y, Gerli R, Doria A et al. Accelerated atherosclerosis in autoimmune rheumatic diseases. *Circulation* 2005. 112: 3337-3347
96. Haug C, Schmid-Kotsas A, Linder T, Jehle PM, Bachem MG, Gruenert A, Rozdzinski E. The immunosuppressive drug mycophenolic acid reduces

endothelin-1 synthesis in endothelial cells and renal epithelial cells. *Clinical Science* 2002. 103 (S48): 76-80.

97. Guo H, Leung JCK, Chan LYY, Lui SL, Tsang AWL, Lai KN. Modulation of intra-pulmonary TGF- $\beta$  expression by mycophenolate mofetil in lupus prone MRL/lpr mice. *Lupus* 2005. 14: 583-592.
98. Bullingham RE, Nicholls AJ, Kamm BR. Clinical pharmacokinetics of mycophenolate mofetil. *Clin Pharmacokinet* 1998. 34: 429-455
99. Bullingham RE, Nicholls A, Hale M. Pharmacokinetics of mycophenolate mofetil (RS61443): a short review. *Transplant Proc* 1996. 28: 925-929.
100. Warrens AN. The evolving role of mycophenolate mofetil in renal transplantation. *Q J Med* 2000. 93: 15-20.
101. McMurray RW, Elbourne KB, Lagoo A, Lal S. Mycophenolate mofetil suppresses autoimmunity and mortality in the female NZB x NZW F1 mouse model of systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1998. 25: 2364-2370.
102. Ramos MA, Pinera C, Setien MA et al. Modulation of autoantibody production by mycophenolate mofetil: effects of the development of SLE in (NZB x NZW)F1 mice. *Nephron Dial Transplant* 2003. 18: 878-883.
103. Glicklich D, Acharya A. Mycophenolate mofetil therapy for lupus nephritis refractory to intravenous cyclophosphamide. *Am J Kidney* 1998. 32: 318-322.

104. Dooley MA, Cosio FG, Nachman PH et al. Mycophenolate mofetil therapy in lupus nephritis: clinical observations. *J Am Soc Nephrol* 1999. 10: 833-839.
105. Gaubitz M, Schorat A, Schotte H, Kern P, Domschke W. Mycophenolate mofetil for the treatment of systemic lupus erythematosus: an open pilot trial. *Lupus* 1999. 8: 731-6.
106. Chan TM, Li FK, Tang CSO, Wong RWS, Fang GX, Ji YL, et al. Efficacy of mycophenolate mofetil in patients with diffuse proliferative lupus nephritis. *N Engl J Med* 2000. 343: 1156-62.
107. Kingdon EJ, McLean AG, Psimenou E, Davenport A, Powis SH, Sweny P, Burns A. The safety and efficacy of MMF in lupus nephritis: a pilot study. *Lupus* 2001. 10: 606-11.
108. Karim MY, Alba P, Cuadrado MJ, Abbs IC, D'Cruz DP, Khamashta MA, Hughes GR. Mycophenolate mofetil for systemic lupus erythematosus refractory to other immunosuppressive agents. *Rheumatology*. 2002. 41: 876-82.
109. Ginzler EM, Aranow C, Buyon J. A multicenter study of mycophenolate mofetil (MMF) vs. intravenous cyclophosphamide (CYC) as induction therapy for severe lupus nephritis (LN): preliminary results. *Arthritis Rheum* 2003. 48: S1690.
110. Kapitsinou PP, Boletis JN, Skopouli FN, Boki KA, Moutsopoulos HM. Lupus nephritis: treatment with mycophenolate mofetil. *Rheumatology* 2004. 43(3): 377-80.

111. Contreras G, Pardo V, Leclercq B et al. Sequential therapies for proliferative lupus nephritis. *N Engl J Med* 2004. 350: 971-980.
112. Ong LM, Hooi LS, Lim TO et al. Randomized controlled trial of pulse intravenous cyclophosphamide versus mycophenolate mofetil in the induction therapy of proliferative lupus nephritis. *Nephrology* 2005. 10: 504-510.
113. Chan TM, Tse KC, Tang CS, Mok MY, Li FK. Long term study of mycophenolate mofetil as continuous induction and maintenance treatment for diffuse proliferative lupus nephritis. *J Am Soc Nephrol* 2005. 16: 1076-1084.
114. Ginzler EM, Dooley MA, Aranow C et al. Mycophenolate mofetil or intravenous cyclophosphamide for lupus nephritis. *N Engl J Med* 2005. 353: 2219-2228.
115. Goyal S, Noursari HC. Treatment of resistant discoid lupus erythematosus of the palms and soles with mycophenolate mofetil. *J Am Acad Dermatol* 2001. 45: 142-144.
116. Pisoni CN, Sanchez FJ, Karim Y et al. Mycophenolate mofetil in systemic lupus erythematosus: efficacy and tolerability in 86 patients. *J Rheumatol* 2005. 32: 1047-1052.
117. Gaubitz M, Schorat A, Schotte H, Kern P, Domschke W. Mycophenolate mofetil for the treatment of systemic lupus erythematosus: an open pilot trial. *Lupus* 1999. 8: 731-736.

118. Vasoo S, Thumboo J, Fong KY. Refractory immune thrombocytopenia in systemic lupus erythematosus: response to mycophenolate mofetil. *Lupus* 2003. 12: 630-632.
119. Chang HK. Successful treatment of refractory thrombocytopenia with mycophenolate mofetil in a patient with systemic lupus erythematosus. *J Korean Med Sci* 2005. 20: 883-885.
120. Alba P, Karim MY, Hunt BJ. Mycophenolate mofetil as a treatment for autoimmune haemolytic anaemia in patients with systemic lupus erythematosus and antiphospholipid syndrome. *Lupus* 2003. 12: 633-635.
121. Howard J, Hoffbrand AV, Prentice HG, Metha A. Mycophenolate mofetil for the treatment of refractory autoimmune haemolytic anaemia and auto-immune thrombocytopenia purpura. *Br J Haematol* 2002. 117: 712-715.
122. Samad AS, Lindsley CB. Treatment of pulmonary hemorrhage in childhood systemic lupus erythematosus with mycophenolate mofetil. *South Med J* 2003. 96:705-707.
123. Shihab FS, Bennett WM, Yi H, Choi SO, Andoh TF. Mycophenolate mofetil ameliorates arteriopathy and decreases transforming growth factor-beta1 in chronic cyclosporine nephrotoxicity. *Am J Transplant* 2003. 3: 1550-1559.
124. Grisanti M, Nader A, Caciuttolo R. Central nervous system involvement due to systemic lupus erythematosus/antiphospholipid syndrome: successful treatment with mycophenolate mofetil. *Lupus* 2001. 10: S31 (abstract 76).

125. Jose J, Paulose BK, Vasuki Z, Danda D. Mycophenolate mofetil in neuropsychiatric systemic lupus erythematosus. *Indian J Med Sci* 2005. 59: 353-356.
126. Riskalla MM, Somers EC, Fatica RA, McCune WJ. Tolerability of mycophenalte mofetil in patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 2003. 30: 1508-1512.
127. Opelz G, Dohler B. Lymphomas after solid organ transplantation: a collaborative transplant study report. *Am J Transplant* 2004. 4: 222-2230.
128. Snanoudj R, Durrbach A, Leblond V et al. Primary brain lymphomas after kidney transplantation: presentation and outcome. *Transplanatation* 2003. 76: 930-937.
129. Zandman-Goddard G, Shoenfeld Y. Infections and SLE. *Autoimmunity* 2005. 38: 473-485
130. Dasgupta N, Gelber AC, Racke F, Fine DM. Central nervous system lymphoma associated with mycophenolate mofetil in lupus nephritis. *Lupus* 2005. 14: 910-913.
131. Bernatsky S, Ramsey-Goldman R, Rajan R et al. Non-Hodgkin's lymphoma in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2005. 64: 1507-1509.
132. Gorgos L, Goldman D, Petri M. The ACR/SLICC damage index in systemic lupus erythematosus (SLE). *Arthritis Rheum* 1993. 36: S68.



133. Bijl M, Horst G, Bootsma H, Limburg PC, Kallenberg CGM. Mycophenolate mofetil prevents a clinical relapse in patients with systemic lupus erythematosus at risk. *Ann Rheum Dis* 2003. 62: 534-9.
134. Donadio GM JV, Holley KE, Ferguson RH, Ilstrup DM. Treatment of diffuse proliferative lupus nephritis with prednisone and combined cyclophosphamide. *N Eng J Med* 1978. 299: 1151-55.
135. Moroni G, Doria A, Mosca M, Todesco S et al. A randomized pilot trial comparing cyclosporine and azathioprine for maintenance therapy in diffuse lupus nephritis over four years. *Clin J Am Soc Nephrol*. 1: 925-932, 2006.
136. Tan EM, Cohn AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982. 25: 1271.

**PRINCIPALI ARTICOLI INERENTI IL LUPUS  
ERITEMATOSO SISTEMICO PUBBLICATI NEL  
CORSO DEL DOTTORATO DI RICERCA (2005–2007).**

*In grassetto sono citate le pubblicazioni riportate negli allegati*

**1: Iaccarino L, Arienti S, Rampudda M, Canova M, Atzeni F, Sarzi Puttini P, Doria A. Mycophenolate mofetil in lupus glomerulonephritis: effectiveness and tolerability. Ann N Y Acad Sci. 2007 Sep;1110:516-24. (ALLEGATO A)**

2: Bizzaro N, Ghirardello A, Zampieri S, Iaccarino L, Tozzoli R, Ruffatti A, Villalta D, Tonutti E, Doria A. Anti-prothrombin antibodies predict thrombosis in patients with systemic lupus erythematosus: a 15-year longitudinal study. J Thromb Haemost. 2007 Jun;5(6):1158-64.

**3: Iaccarino L, Rampudda M, Canova M, Della Libera S, Sarzi-Puttini P, Doria A. Mycophenolate mofetil: what is its place in the treatment of autoimmune rheumatic diseases? Autoimmun Rev. 2007 Jan;6(3):190-5. Epub 2006 Dec 1. Review. (ALLEGATO B)**

**4: Doria A, Iaccarino L, Ghirardello A, Zampieri S, Arienti S, Sarzi-Puttini P, Atzeni F, Piccoli A, Todesco S. Long-term prognosis and causes of death in systemic lupus erythematosus. Am J Med. 2006 Aug;119(8):700-6. (ALLEGATO C)**

5: Doria A, Iaccarino L, Sarzi-Puttini P, Ghirardello A, Zampieri S, Arienti S, Cutolo M, Todesco S. Estrogens in pregnancy and systemic lupus erythematosus. *Ann N Y Acad Sci.* 2006 Jun;1069:247-56. Review.

6: Rinaldi S, Ghisi M, Iaccarino L, Zampieri S, Ghirardello A, Sarzi-Puttini P, Ronconi L, Perini G, Todesco S, Sanavio E, Doria A. Influence of coping skills on health-related quality of life in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2006 Jun 15;55(3):427-33.

**7: Doria A, Iaccarino L, Arienti S, Rampudda M, Canova M, Rondinone R, Todesco S. Mycophenolate Mofetil and systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2006; 15: 44-54. (ALLEGATO D)**

8: Zampieri S, Alaibac M, Iaccarino L, Rondinone R, Ghirardello A, Sarzi-Puttini P, Peserico A, Doria A. Tumour necrosis factor alpha is expressed in refractory skin lesions from patients with subacute cutaneous lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis.* 2006 Apr;65(4):545-8. Epub 2005 Aug 11.

9: Bano S, Bombardieri S, Doria A, Iaccarino L, Lehmann P, Mosca M. Lupus erythematosus and the skin. *Clin Exp Rheumatol.* 2006 Jan-Feb;24(1 Suppl 40):S26-35. Review.

10: Briani C, Zara G, Rondinone R, Iaccarino L, Ruggero S, Toffanin E, Ermani M, Ghirardello A, Zampieri S, Sarzi-Puttini P, Doria A. Positive and negative effects of thalidomide on refractory cutaneous lupus erythematosus. *Autoimmunity.* 2005 Nov;38(7):549-55.

11: Sarzi-Puttini P, Atzeni F, Iaccarino L, Doria A. Environment and systemic lupus erythematosus: an overview. *Autoimmunity*. 2005 Nov;38(7):465-72. Review.

12: Doria A, Iaccarino L, Sarzi-Puttini P, Atzeni F, Turriel M, Petri M. Cardiac involvement in systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2005;14(9):683-6. Review.

13: Zampieri S, Iaccarino L, Ghirardello A, Tarricone E, Arienti S, Sarzi-Puttini P, Gambari PF, Doria A. Systemic lupus erythematosus, atherosclerosis, and autoantibodies. *Ann N Y Acad Sci*. 2005 Jun;1051:351-61. Review.

## ABBREVIAZIONI (in ordine alfabetico)

LES	Lupus eritematoso sistemico
GN	Glomerulonefrite
CYF	Ciclofosfamide
AZA	Azatioprina
CYA	Ciclosporina A
MMF	Micofenolato mofetile
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i>
IC	Immunocomplessi
TCR	<i>T cell receptor</i>
FcR $\gamma$ 2a	Recettore per la porzione Fc delle Ig G
ANA	Anticorpi rivolti verso antigeni nucleari
ENA	Antigeni nucleari estraibili in soluzione salina
anti-nDNA	Anticorpi contro il DNA nativo
LA	<i>Lupus anticoagulant</i>
TGF- $\beta$	<i>Transforming growth factor <math>\beta</math></i>
LECA	Lupus eritematoso cutaneo acuto
LECS	Lupus eritematoso cutaneo subacuto
LECC	Lupus eritematoso cutaneo cronico
IF	Immunofluorescenza
PCR	Proteina c reattiva
TAC	Tomografia assiale computerizzata
VES	Velocità di eritrosedimentazione
IGIV	Immunoglobuline endovena
MO	Microscopio ottico
ME	Microscopio elettronico
ISN/RPS	Società Internazionale di Nefrologia e di Patologia Renale

VFG	Velocità di filtrazione glomerulare
NIH	<i>National Institute of Health di Bethesda</i>
ACE	<i>Angiotensin converting enzyme</i>
NK	<i>Natural killer</i>
LAK	<i>Lymphokine activated killer cells</i>
ANCA	<i>Antineutrophil cytoplasmic antibodies</i>
NFAT	<i>Nuclear factor of activated T cell</i>
IL-2	Interleuchina 2
JNK	<i>Janus kinase</i>
MAPK	<i>Mitogen activated protein kinase</i>
FANS	Antinfiammatori non steroidei
ADCC	Citotossicità anticorpo dipendente
HSCT	<i>Haemopoietic Stem Cell Transplantation</i>
ECLAM	<i>European Consensus Lupus Activity Measurement</i>

# **ALLEGATO “A”**

# **ALLEGATO “B”**



# **ALLEGATO “C”**

# **ALLEGATO “D”**