



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
Facoltà di Medicina e Chirurgia

Corso di Laurea in Tecniche di Laboratorio Biomedico

Sviluppo di un metodo ELISA per la quantificazione della proteina antimicrobica umana 18 kDa (hCAP-18) derivata dai neutrofili, come strumento di screening per la neutropenia

Relatore: Chiar.ma
Prof.ssa Arianna Vignini

Tesi di Laurea di:
Alessandro Veccia

Correlatore: Chiar.ma
Dott.ssa Alice Di Paolo

A. A. 2022-2023

INDICE

Sommario

1. INTRODUZIONE	2
Premessa.....	3
1.1 COMPRENDERE LA NEUTROPENIA	5
1.1.1 Neutropenia: dalla definizione al trattamento	5
<i>1.1.2 Classificazione ed eziopatogenesi della neutropenia</i>	6
1.1.3 Cosa sono i neutrofili?	9
1.1.4 Sintomi della neutropenia	10
1.1.5 Diagnosi della neutropenia	11
1.1.6 Trattamento della neutropenia acuta	14
1.1.7 Trattamento della neutropenia cronica	18
1.2 hCAP-18	20
1.3 Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)	21
1.4 Lo spettrofotometro	24
2. SCOPO DELLA TESI	28
3. MATERIALI E METODI	32
3.1 Arruolamento dei soggetti	33
3.2 Preparazione del plasma ricco in piastrine (PRP)	33
3.3 ELISA hCAP-18	33
3.3.1 Reagenti	33
3.3.2 Preparazione delle soluzioni	34
3.3.3 Protocollo ELISA hCAP-18	35
3.3.4 Costruzione della curva standard	37
3.4 Western Blot	40
3.4.1 Preparazione dei campioni per il Western Blot e determinazione del contenuto proteico secondo la metodica del Bradford	40
3.4.2 Protocollo Western Blot	42
5. DISCUSSIONE	50
6. CONCLUSIONI	53
7. BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA	55
8. RINGRAZIAMENTI	61

1. INTRODUZIONE

Premessa

La mancanza di neutrofili circolanti, definita con il termine neutropenia, solleva sempre preoccupazioni poiché rende i pazienti suscettibili alle infezioni. Lo stato può verificarsi a causa della ridotta produzione di neutrofili nel midollo osseo, dall'aumento della redistribuzione periferica o dell'aumento del sequestro da parte dei tessuti, ma può anche essere causato da fattori estrinseci come infezioni, chemioterapia e alcuni farmaci (Bartels M et al., 2016) (Boxer LA, 2012).

La neutropenia non è un referto clinico insolito nei bambini, e quando la sua durata supera i tre mesi con una conta assoluta dei neutrofili (ANC) inferiore a $1.5 \times 10^9/L$, è classificata come cronica. La causa, alla base della neutropenia cronica, può dipendere da una malattia grave, come nella neutropenia congenita grave (SNC), da una neutropenia benigna e transitoria causata principalmente dagli anticorpi anti-neutrofili specifici come nella neutropenia autoimmune (AIN). A causa di questa notevole differenza nella gravità dell'esito clinico, è essenziale distinguere tra i diversi tipi di neutropenia. Pertanto, risulta chiaro che la diagnosi differenziale può essere difficile, per cui vengono spesso eseguite indagini approfondite e invasive, anche in casi di neutropenia benigna. Inoltre, la misurazione dei neutrofili nel sangue periferico stima solo il pool circolante, che può essere influenzato da vari fattori e non va quindi a riflettere necessariamente la mielopoiesi nel midollo osseo. Sono quindi necessari ulteriori marcatori ematici di malattie gravi, e specifici della funzione del midollo osseo mielopoietico, che possono essere facilmente applicati nell'analisi clinica (Mörtberg A et al., 2021).

In uno studio iniziale, è stato proposto che i livelli plasmatici della proteina antimicrobica catelicidina umana hCAP-18, la pro-proteina del peptide antimicrobico LL-37, potrebbe essere utilizzato per differenziare i casi più gravi di neutropenia da quelli benigni, in quanto i precursori dei neutrofili del midollo osseo sono la principale fonte di hCAP-18 nella circolazione. Nello studio è stato evidenziato come i livelli di hCAP-18 erano bassi o non rilevabili nei casi più severi, mentre le forme meno gravi di neutropenia mostravano livelli più facilmente rilevabili. I livelli di hCAP-18 nel sangue sono bassi nella SNC, a causa dell'arresto della maturazione del midollo osseo, ma livelli normali sono riportati nella AIN con normale funzione del midollo osseo. Sono noti i valori di riferimento per hCAP-18 negli adulti, ma mancano per i bambini (Jackmann N et al., 2022).

Pertanto, lo scopo del presente studio è stato quello di sviluppare un metodo ELISA per la quantificazione della proteina antimicrobica umana 18 kDa (hCAP-18) derivata dai neutrofili, utilizzabile come strumento di screening per la neutropenia.

1.1 COMPRENDERE LA NEUTROPENIA

1.1.1 Neutropenia: dalla definizione al trattamento

Con il termine neutropenia si indica una riduzione del numero di neutrofili circolanti. Se di grave entità, aumenta il rischio e la gravità di infezioni batteriche e fungine. I sintomi locali di infezione possono essere variabili, ma la febbre è presente durante le infezioni più gravi. La diagnosi viene effettuata attraverso la valutazione del numero dei globuli bianchi con formula, ed è anche necessario identificarne la causa. Se è presente febbre, si può sospettare un'infezione, ed è immediatamente necessario iniziare una terapia antibiotica, ad ampio spettro, specialmente se siamo in presenza di una forma di neutropenia grave. La terapia antifungina (es. azoli, echinocandine o polieni) va aggiunta se la febbre persiste dopo 4 giorni dall'applicazione del regime antibiotico (Bertelli G, 2020).

Il trattamento va poi adattato in base ai risultati delle colture e dell'antibiogramma, a causa del rischio di selezione di microrganismi resistenti. La terapia antibiotica/antimicotica può essere associata all'utilizzo di fattori di crescita mieloidi, come il G-CSF (fattore stimolante le colonie dei granulociti) o il GM-CSF (fattore stimolante le colonie granulocito-macrofagiche), che favoriscono la differenziazione dei precursori dei neutrofili e attivano la mobilitazione nel midollo osseo delle staminali.

A volte, per influenzare la produzione, la distribuzione e la distruzione dei neutrofili, possono essere utilizzate vitamine, immunoglobuline, farmaci immunosoppressivi, corticosteroidi e trasfusioni di granulociti.

I granulociti neutrofili sono la principale difesa dell'organismo contro le infezioni batteriche e le infezioni fungine. Quando è presente una neutropenia, la risposta infiammatoria a queste infezioni risulta attutita.

Il minimo valore normale del numero dei neutrofili (numero totale di globuli bianchi \times % di neutrofili e dei loro precursori) è $1500/\mu\text{L}$ ($1.5 \times 10^9/\text{L}$) nella razza bianca ed è alquanto più basso nella razza nera [(circa $1200/\mu\text{L}$ ($1.2 \times 10^9/\text{L}$)]. La conta dei neutrofili non è stabile come la conta di altre cellule e possono variare considerevolmente in un breve lasso di tempo, a seconda di molti fattori come lo stato di attività, l'ansia, la presenza di infezioni ed eventuali farmaci assunti. Pertanto, durante la determinazione della gravità della neutropenia possono essere necessarie diverse misurazioni.

Il trattamento della neutropenia comprende:

- Trattamento delle condizioni associate (p.e. infezioni, stomatite)
- Profilassi antibiotica (talvolta)
- Utilizzo di fattori di crescita mieloidi
- Sospensione del sospetto agente eziologico (p.e. farmaci)
- A volte utilizzo di corticosteroidi

1.1.2 Classificazione ed eziopatogenesi della neutropenia

La neutropenia può presentarsi in forma acuta o cronica.

La **neutropenia acuta** (che si verifica nel corso di alcune ore o pochi giorni) può svilupparsi a seguito di:

- Consumo rapido dei neutrofili o distruzione degli stessi
- Alterata produzione dei neutrofili

La **neutropenia cronica** (che dura da mesi o anni) in genere nasce come risultato di:

- Produzione ridotta di neutrofili/eccessivo sequestro splenico

La neutropenia può essere classificata anche come:

- **Primaria:** dovuta a un difetto intrinseco nelle cellule mieloidi midollari

- **Secondaria:** dovuta a fattori estrinseci alle cellule mieloidi midollari (cause più frequenti sono i farmaci, le infezioni e le reazioni immunitarie, i processi infiltrativi del midollo)

La **gravità della neutropenia** è correlata direttamente al rischio relativo di contrarre una infezione e viene classificata come segue:

- Lieve: da 1000 a 1500/ μL (da 1 a $1.5 \times 10^9/\text{L}$)
- Moderata: da 500 a 1000/ μL (da 0.5 a $1 \times 10^9/\text{L}$)
- Grave: $< 500/\mu\text{L}$ ($< 0.5 \times 10^9/\text{L}$)

Quando la conta dei neutrofili scende $< 500/\mu\text{L}$, la flora microbica endogena (p.e. nel cavo orale o a livello intestinale) può causare infezioni. Se il conteggio scende a $< 200/\mu\text{L}$ ($< 0.2 \times 10^9/\text{L}$), la risposta infiammatoria potrebbe essere disattivata e potrebbero non riscontrarsi i comuni segni infiammatori della leucocitosi o presenza dei leucociti nelle urine o nel sito di infezione.

La neutropenia acuta grave può portare ad infezioni rapidamente fatali, in particolare se è presente significativamente un fattore che danneggia il sistema immunitario (p.e. un carcinoma). Anche l'integrità di cute e mucose, la vascolarizzazione dei tessuti e lo stato nutrizionale del paziente influenzano il rischio di infezioni (Dale DC, 2023).

Le **infezioni che più frequentemente si manifestano** nei pazienti con profonda neutropenia sono

- Cellulite
- Foruncolosi
- Polmonite
- Sepsi

- Sinusite

La neutropenia è una riduzione del numero dei granulociti neutrofili circolanti nel sangue (Figura 1). Se di grave entità, questa condizione aumenta la suscettibilità alle infezioni.

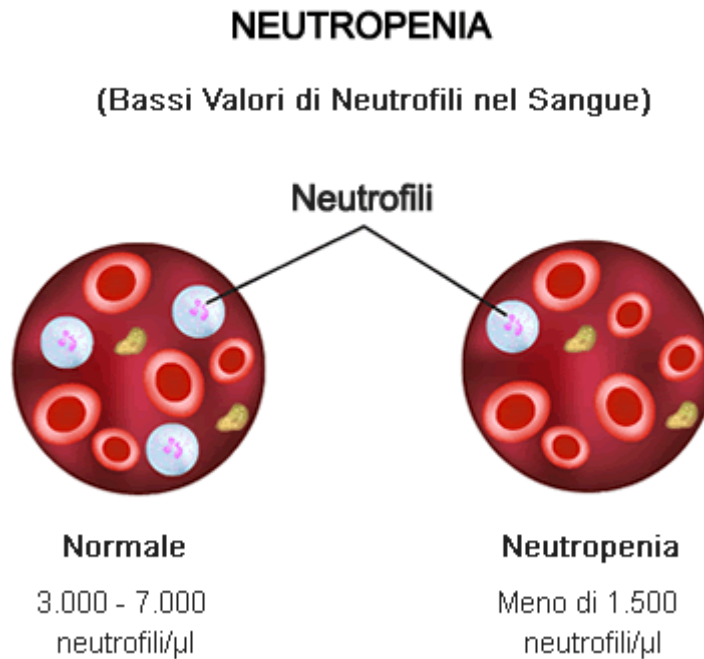


Figura 1: valori di neutrofili nel sangue

La neutropenia può dipendere da molteplici cause, quali, ad esempio, malattie del sangue, carenze vitaminiche, esposizione ad agenti tossici, uso di alcuni farmaci e reazioni immunitarie (Bertelli G, 2020).

Esistono anche forme di neutropenia a carattere familiare (associate ad alterazioni genetiche) e idiopatiche (di cui non si conosce la causa). Di solito, la neutropenia rimane asintomatica fino a quando non si sviluppa uno stato infettivo. Le manifestazioni che ne conseguono possono essere variabili, ma la febbre è sempre in atto durante le infezioni più gravi.

La diagnosi viene effettuata attraverso la valutazione dell'emocromo con formula leucocitaria; tuttavia, è importante identificare anche la causa

scatenante, per poter correggere, dove possibile, la situazione e instaurare il trattamento più adeguato.

In presenza di marcata neutropenia, è necessario iniziare immediatamente un'antibiotico-terapia empirica ad ampio spettro.

1.1.3 Cosa sono i neutrofili?

I neutrofili costituiscono il 50-80% della popolazione leucocitaria (insieme di globuli bianchi presenti nel sangue). In condizioni fisiologiche, queste cellule immunitarie giocano un ruolo cruciale nei meccanismi di difesa dell'organismo contro gli agenti estranei, soprattutto infettivi. I neutrofili sono capaci di operare la fagocitosi, ossia inglobano e digeriscono microrganismi e particelle anomale presenti nel sangue e nei tessuti. Le loro funzioni sono perfettamente concatenate ed integrate con quelle del sistema monocito-macrofagico e dei linfociti.

Il sangue del soggetto adulto contiene normalmente dai 3.000 ai 7.000 neutrofili/ μ L. L'organo che produce queste cellule è il midollo osseo, dove le cellule staminali proliferano e differenziano ad elementi riconoscibili morfologicamente come mieloblasti. Attraverso una serie di processi maturativi, questi diventano granulociti (così definiti per la presenza nel loro citoplasma di vescicole contenenti complessi enzimatici organizzati in granuli ben evidenti).

I neutrofili neoformati circolano nel sangue per 7-10 ore, per poi migrare nei tessuti, dove vivono solo per pochi giorni.

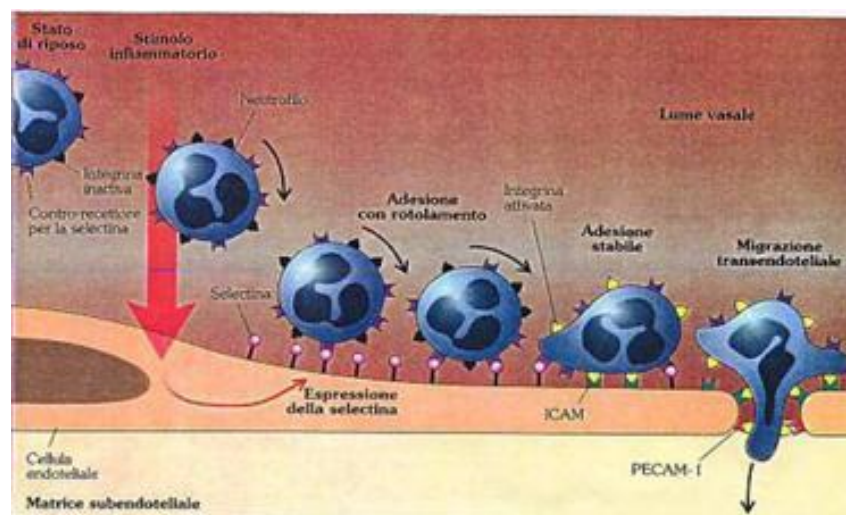


Figura 2: migrazione dei neutrofilo nei tessuti

1.1.4 Sintomi della neutropenia

La neutropenia può comparire:

- Improvvisamente, nel giro di poche ore o giorni, in risposta a determinate infezioni o esposizioni
- Gradualmente

Poiché la neutropenia di per sé non causa sintomi specifici, di solito viene diagnosticata al verificarsi di un'infezione. Possono comparire febbre e ulcerazioni dolorose attorno alla bocca e all'ano. Possono anche verificarsi polmonite batterica e altre gravi infezioni (Territo M, 2020).

Nella *neutropenia cronica* idiopatica o con un numero di neutrofilo $<200/\mu\text{L}$ ($<0.2 \times 10^9/\text{L}$), è possibile che il soggetto non manifesti molti sintomi se il numero di neutrofilo non è estremamente basso.

Quando la *neutropenia* è *causata da farmaci*, il soggetto può manifestare febbre, eruzione cutanea e ingrossamento dei linfonodi. Nella *neutropenia ciclica*, il soggetto può manifestare sintomi altalenanti dovuti all'aumento e alla diminuzione ciclici della conta leucocitaria nel tempo.

1.1.5 Diagnosi della neutropenia

Poiché la neutropenia non ha sintomi specifici, spesso non si sospetta la presenza del disturbo a meno che il soggetto non sia affetto da infezioni frequenti o anomale.

La diagnosi della neutropenia è imprescindibile dai seguenti step:

- Sospetto clinico (infezioni ripetute o atipiche)
- Emocromo con formula leucocitaria
- Valutazione dell'infezione con colture e imaging
- Identificazione del meccanismo e della causa della neutropenia

Sospetto clinico

La neutropenia va sospettata in pazienti con infezioni frequenti, gravi o atipiche o in pazienti a rischio (p.e. quelli che ricevono terapie con farmaci citotossici o radioterapia) (Dale D C, 2023).

Emocromo con formula leucocitaria

La conferma di neutropenia è data dall'emocromo con formula leucocitaria (o emogramma), un semplice esame del sangue che permette la determinazione percentuale dei vari tipi cellulari di leucociti (globuli bianchi) presenti nello striscio di sangue periferico.

Comunemente, la diagnosi di neutropenia si pone quando il numero assoluto dei granulociti neutrofili è inferiore a 1.500 per μL di sangue ($1.5 \times 10^9/\text{L}$). L'osservazione dello striscio del sangue periferico permette anche un primo inquadramento patogenetico, che andrà poi approfondito attraverso l'esame istologico e citologico del midollo osseo.

Valutazione dell'infezione

Il primo passo consiste nel verificare se è presente un'infezione. Dal momento che l'infezione può essere subdola, durante l'esame obiettivo

si devono valutare sistematicamente i siti più comuni di infezione primaria, tra cui ricordiamo:

- Superfici delle mucose, come il tratto alimentare (gengive, faringe, ano)
- Seni paranasali
- Polmoni
- Addome
- Tratto urinario
- Pelle e unghie
- Siti di venipuntura
- Cateteri vascolari

Se la neutropenia è acuta o grave, le indagini di laboratorio devono essere eseguite rapidamente (Dale D C, 2023).

Le colture rappresentano il cardine della valutazione. Tutti i pazienti febbrili devono avere almeno due set di campioni per emocolture batteriche e fungine. Se è presente un catetere endovena (EV) a permanenza, le colture vanno prelevate dal catetere e da una vena periferica separata. Il materiale proveniente da drenaggi persistenti o cronici può essere usato anche per colture per batteri, funghi e micobatteri atipici. Le ulcere della mucosa vanno tamponate e utilizzate per la ricerca del *virus herpes* e della *Candida*. Eventuali lesioni cutanee vanno asportate o sottoposte a biopsie per esami citologici e colturali. I campioni per l'analisi delle urine e l'urino coltura devono essere prelevati da tutti i pazienti. Se è presente diarrea, va verificata la presenza nelle feci di batteri enteropatogeni e tossine di *Clostridioides* (precedentemente *Clostridium*) *difficile*. Le colture dell'espettorato si ottengono per valutare le infezioni polmonari.

Anche gli studi di imaging sono utili. In tutti i pazienti va eseguita una RX torace. Una TC del torace può anche essere necessaria nei

pazienti con neutropenia. La TC dei seni paranasali può essere utile se sono presenti sintomi o segni di sinusite (p.e. cefalea posizionale, dolore mascellare o dei denti dell'arcata superiore, edema facciale, rinorrea). La TC dell'addome viene eseguita solitamente se i sintomi (p.e. il dolore) o l'anamnesi (p.e. un intervento chirurgico recente) suggeriscono un'infezione intra-addominale.

Identificazione delle cause

Successivamente, vanno determinati il meccanismo e la causa della neutropenia. L'anamnesi è tesa a valutare la storia familiare, la presenza di altri disturbi, l'assunzione di eventuali farmaci o di altri preparati, l'eventuale presenza di animali da compagnia, e la possibile ingestione o esposizione a tossine.

L'esame obiettivo ricerca la presenza di una splenomegalia, di una linfadenopatia, di lesioni cutanee (p.e. aree di eritema, macule, papule, pustole) e di segni di altre patologie sottostanti (p.e. artrite).

Se non viene identificata alcuna causa ovvia (p.e. la chemioterapia), il test più importante è l'esame del midollo osseo.

L'esame del midollo osseo stabilisce se la neutropenia è dovuta a ridotta produzione da parte del midollo osseo o è secondaria ad aumentata distruzione cellulare (determinato da una normale o aumentata produzione delle cellule mieloidi). L'esame del midollo osseo può anche suggerire la causa specifica della neutropenia (p.e. aplasia midollare, mielofibrosi, disturbo mielodisplastico, leucemia acuta, cancro metastatico, necrosi midollare).

Ulteriori test, come la citometria a flusso e il riarrangiamento del gene del recettore delle cellule T per la sindrome LGL (malattia clonale

dei grandi linfociti granulari), possono essere necessari per determinare la causa della neutropenia, a seconda della diagnosi sospettata. In pazienti a rischio di carenze nutrizionali, vanno dosati i livelli di rame, folato e vitamina B12. Bisogna valutare la presenza degli anticorpi anti-neutrofili nel caso si sospetti una neutropenia immune.

La diagnosi differenziale tra neutropenia causata da alcuni antibiotici e da infezione può talvolta risultare difficile. La conta leucocitaria subito prima dell'inizio di un trattamento antibiotico generalmente riflette una variazione nell'emocromo, dovuta all'infezione.

I pazienti che hanno avuto una neutropenia cronica nella prima infanzia e con anamnesi positiva per febbri ricorrenti e gengivite cronica devono eseguire una conta dei globuli bianchi con formula 3 volte/settimana per 6 settimane, per poterne valutare l'andamento periodico, che può esser indicativo di neutropenia ciclica. Contemporaneamente si valuta il numero di piastrine e di reticolociti. Nei pazienti con neutropenia ciclica, eosinofili, reticolociti e piastrine hanno frequentemente un ciclo in sincronia con i neutrofili, mentre i monociti e i linfociti possono avere un ciclo diverso.

Test genetici molecolari per *ELANE* ed altri geni sono appropriati quando si sospettano cause congenite.

1.1.6 Trattamento della neutropenia acuta

Le infezioni sospette devono essere sempre trattate tempestivamente. Se sono presenti febbre o ipotensione, va sospettata un'infezione grave e vanno somministrate EV dosi elevate di antibiotici empirici a largo spettro. La scelta del regime antibiotico è basata sui più probabili microrganismi infettivi, sulla sensibilità all'antibiotico dei

patogeni in quel particolare ambiente e sulla potenziale tossicità. A causa del rischio di selezione di organismi resistenti, la vancomicina è usata soltanto se si sospettano microrganismi Gram-positivi resistenti ad altri farmaci (Dale D C, 2023).

Cateteri vascolari a permanenza solitamente possono rimanere in situ, anche se si sospetta o si documenta una batteriemia, ma la loro rimozione va considerata se le infezioni coinvolgono *Staphylococcus aureus* o *Bacillus*, *Corynebacterium* o *Candida* o un altro fungo o se le emocolture sono persistentemente positive, nonostante cure antibiotiche appropriate. Le infezioni causate da stafilococchi coagulasi-negativi in genere si risolvono con la sola terapia antibiotica.

I cateteri di Foley a permanenza possono anche predisporre ad infezioni in pazienti neutropenici, e il cambio o la rimozione del catetere devono esser valutati in caso di persistenti infezioni urinarie.

Se le colture risultano positive, la terapia antibiotica va adattata in base ai risultati dell'antibiogramma. Se un paziente sfebbra entro 72 h dall'inizio della terapia antibiotica, gli antibiotici vanno continuati per almeno 7 giorni e fino a quando non scompaiono sintomi o segni di infezione. Quando la neutropenia è transitoria (come quella secondaria a chemioterapia mielosoppressiva), la terapia antibiotica di solito si somministra fino a quando il numero dei neutrofili è $> 500/\mu\text{L}$ ($> 0.5 \times 10^9/\text{L}$). Tuttavia, se la coltura rimane negativa, la sospensione dell'antibiotico-terapia può essere presa in considerazione in pazienti selezionati con neutropenia persistente, specialmente in coloro la cui sintomatologia legata alla flogosi si è risolta.

Febbre che persiste > 72 h nonostante la terapia antibiotica suggerisca:

- Una causa non batterica
- Infezione con una specie resistente

- Superinfezione da una seconda specie batterica
- Inadeguati livelli sierici o tissutali degli antibiotici
- Infezione localizzata, come un ascesso

Pazienti neutropenici con febbre persistente vanno rivalutati ogni 2-4 giorni con esame obiettivo, emocolture e RX torace. Nel caso il paziente stia clinicamente bene, eccetto per la presenza di febbre, il regime antibiotico iniziale può essere continuato, e la febbre indotta da farmaci deve essere considerata. Se invece il paziente peggiora, va presa in considerazione una variazione della terapia antibiotica.

Le infezioni fungine sono la causa più probabile di febbri persistenti e del deterioramento progressivo. La terapia antifungina va aggiunta empiricamente se una febbre inspiegata persiste dopo 3-4 giorni di trattamento antibiotico a largo spettro. La scelta di uno specifico farmaco antifungino (p.e. fluconazolo, caspofungin, voriconazolo, posaconazolo) dipende dal tipo di rischio (p.e. la durata e la gravità della neutropenia, storia pregressa di infezione fungina, febbre persistente nonostante l'uso di un farmaco antimicotico a più ristretto spettro) e deve essere guidata da uno specialista in malattie infettive.

Se la febbre persiste dopo 3 settimane di terapia empirica (comprese 2 settimane di terapia antimicotica) e la neutropenia si è risolta, allora si può considerare la sospensione di tutti gli antimicrobici e va rivalutata la causa della febbre.

Per i pazienti afebrili con neutropenia, può essere considerata la profilassi antibiotica anche se le alterazioni del microbioma batterico possono rallentare il recupero del midollo osseo. Il trattamento con fluorochinoloni (levofloxacin, ciprofloxacina) viene utilizzato in alcuni centri per i pazienti che ricevono regimi chemioterapici che comunemente provocano una neutropenia $\leq 100/\mu\text{L}$ ($\leq 0.1 \times 10^9/\text{L}$) per

> 7 giorni. La profilassi è solitamente avviata dall'oncologo curante. Gli antibiotici sono proseguiti fino a quando la conta dei neutrofili aumenta a $> 1500/\mu\text{L}$ ($> 1.5 \times 10^9/\text{L}$). Inoltre, la terapia antifungina può essere somministrata ai pazienti con neutropenia afebrili a più alto rischio di infezioni fungine (p.e. dopo un trapianto di cellule staminali ematopoietiche, o una chemioterapia intensiva per la leucemia mieloide acuta o un disturbo mielodisplastico, o un'anamnesi di precedenti infezioni fungine). La selezione del farmaco antifungino specifico deve essere guidata da uno specialista in malattie infettive. La profilassi antibiotica e antimicotica non è normalmente raccomandata per pazienti neutropenici afebrili senza fattori di rischio per i quali si prevede che rimarranno neutropenici per < 7 giorni sulla base del loro regime chemioterapico specifico.

I fattori di crescita mieloidi (ossia, il fattore di stimolazione delle colonie granulocito-macrofagiche) sono diffusamente utilizzati per aumentare la conta dei neutrofili e per prevenire le infezioni nei pazienti dopo trapianto di cellule staminali emopoietiche o chemioterapia intensiva oncologica. Qualora il rischio di neutropenia febbrile sia $\geq 30\%$ [come stabilito da una conta dei neutrofili $< 500 \mu\text{L}$ ($< 0.5 \times 10^9/\text{L}$), dalla presenza di un'infezione durante un precedente ciclo di chemioterapia, da patologie associate concomitanti, o con età > 75 anni], è indicato l'uso dei fattori di crescita. In generale, il maggior beneficio clinico si verifica quando il fattore di crescita è somministrato circa 24 h dopo il completamento del ciclo di chemioterapia. Anche i pazienti con neutropenia causata da una reazione idiosincrasica a farmaci possono trarre beneficio dalla somministrazione dei fattori di crescita mieloidi (G-CSF), in particolare se utilizzati per accelerare una ripresa

ritardata. La dose abituale per G-CSF (filgrastim) è da 5 µg/kg sottocute 1 volta/die, e la dose per pegilato G-CSF (pegfilgrastim) è di 6 mg sottocute 1 volta per ciclo di chemioterapia.

I glucocorticoidi, gli steroidi anabolizzanti e le vitamine non stimolano la produzione dei neutrofili e generalmente non sono utili nei pazienti con neutropenia. Se si sospetta che la neutropenia acuta sia causata da un farmaco o da una tossina, tutti i potenziali agenti eziologici vanno sospesi. Se la neutropenia si sviluppa durante un trattamento con un antibiotico noto per indurre una riduzione della conta dei globuli bianchi (p.e. cloramfenicolo), allora si raccomanda di passare a un antibiotico alternativo.

Gargarismi con soluzione fisiologica o con acqua ossigenata a intervalli di qualche ora, sciacqui orali liquidi (contenenti lidocaina viscosa, difenidramina e antiacido liquido), pastiglie anestetiche (benzocaina 15 mg ogni 3 o 4 h), o sciacqui del cavo orale con clorexidina (soluzione all'1%) 2 o 3 volte/die possono alleviare il fastidio di stomatiti con ulcerazioni orofaringee.

La candidosi orale o esofagea va trattata con nistatina (da 400 000 a 600 000 unità, sciacqui orali 4 volte/die; va invece ingerita, se vi è esofagite), compresse di clotrimazolo (10 mg sciolti lentamente in bocca 5 volte/die) o antifungini sistemici (p.e. fluconazolo).

Una dieta semi-solida o liquida può rendersi necessaria nel caso di stomatite o esofagite gravi, e analgesici topici (p.e. lidocaina viscosa) possono essere necessari per ridurre il disagio.

1.1.7 Trattamento della neutropenia cronica

La produzione e la distribuzione dei neutrofili nella neutropenia congenita, nella neutropenia ciclica e nella neutropenia idiopatica sono

di solito aumentate con la somministrazione di G-CSF da 1 a 10 µg/kg per via sottocutanea una volta/die, iniziando con una dose bassa e aumentando per mantenere un livello di circa 1000/µL ($1 \times 10^9/L$). L'efficacia è mantenuta con una somministrazione giornaliera intermittente di G-CSF per mesi o addirittura anni (Dale D C, 2023).

La somministrazione di G-CSF a lungo-termini è stata anche impiegata in altri soggetti con neutropenia poco profonda (compresi quelli con mielodisplasia, infezione da HIV, malattie autoimmuni). I benefici clinici del trattamento con G-CSF sono meno chiari, soprattutto per i pazienti che non hanno una neutropenia grave. Per pazienti con malattie autoimmuni, come alcuni pazienti con sindrome LGL (malattia clonale dei grandi linfociti granulari) o che sono stati sottoposti a un trapianto d'organo, la ciclosporina può altresì essere utile (Dale D C, 2022).

In passato, la splenectomia era utilizzata per incrementare il numero dei neutrofili nei pazienti con splenomegalia e sequestro splenico di neutrofili (p.e. la sindrome di Felty); tuttavia, dato che i fattori di crescita ed altre nuove terapie sono spesso efficaci, la splenectomia deve essere limitata. La splenectomia può essere considerata per i pazienti con splenomegalia dolorosa persistente o con neutropenia grave [ossia, $< 500/\mu L$ ($< 0.5 \times 10^9/L$)] e con seri problemi infettivi in cui altri trattamenti hanno fallito. I pazienti devono essere vaccinati contro le infezioni causate da *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, e *Haemophilus influenzae* prima della splenectomia, perché tale intervento predispone i pazienti alle infezioni da parte di microrganismi incapsulati.

1.2 hCAP-18

La catecolamina umana hCAP-18 (pro-LL-37) è la proteina del peptide antimicrobico LL-37. L'hCAP-18 può essere prodotto da molti tipi cellulari diversi, ma i precursori dei neutrofili del midollo osseo ne sono la principale fonte nella circolazione. La conta dei neutrofili viene utilizzata come marcatore della mielopoiesi, ma non sempre riflette la produzione di neutrofili nel midollo osseo e quindi sono necessari marcatori aggiuntivi.

L'hCAP-18 è l'unico membro umano della famiglia di proteine antibatteriche e leganti le endotossine note come catelicidine. I domini antibatterici e leganti l'endotossina risiedono nei 37 aminoacidi C-terminali della proteina (LL-37) e si ritiene che questi siano liberati dall'N-terminale neutralizzate dalle proteasi dei granuli perossidasi positivi. Nei neutrofili umani, i granuli perossidasi positivi e perossidasi negativi possono essere suddivisi in sottoinsiemi di granuli che differiscono per contenuto proteico e capacità di essere esocitati (Sørensen O et al., 1997).

Circa due terzi dell'emopoiesi nel midollo osseo sono dedicati alla mielopoiesi, con circa 10^9 neutrofili/kg di peso corporeo generati ogni giorno negli esseri umani sani. I neutrofili sono distribuiti in pool proliferativi, circolanti e marginali. La misurazione dei neutrofili nel sangue periferico stima il pool circolante, che può essere influenzato da vari fattori, come l'autoimmunità, le infezioni, le infiammazioni e il trattamento con glucocorticoidi, e quindi non riflette necessariamente la mielopoiesi nel midollo osseo. Pertanto, sono necessari marcatori specifici della funzione del midollo osseo mielopoietico.

La catelicidina umana hCAP-18 è la pro-proteina del peptide antimicrobico LL-37. L'hCAP-18 presente nel sangue deriva dal midollo osseo, dove viene prodotto durante la formazione dei granuli nello stadio di

differenziazione dei neutrofili da mielociti a metamielociti. L'hCAP-18 può essere un marcatore di mielopoiesi più specifico rispetto all'ANC poiché i precursori differenzianti dei neutrofili nel midollo osseo sono la principale fonte di hCAP-18. I livelli di hCAP-18 nel sangue sono bassi nella neutropenia congenita con arresto della maturazione del midollo osseo, ma livelli normali sono riportati nella neutropenia autoimmune con normale funzione del midollo osseo (Karlsson J et al., 2007) (Ye Y et al., 2015). Un livello ridotto di hCAP-18 nel plasma è stato associato a infezioni parodontali ricorrenti in pazienti con neutropenia congenita grave e con mucosite orale in bambini affetti da leucemia. La vitamina D ha la capacità di indurre hCAP-18/LL-37 nei leucociti e nelle cellule epiteliali, ma non è noto se lo stato della vitamina D influisca sui livelli ematici di hCAP-18. Sono noti in letteratura i valori di riferimento per hCAP-18 negli adulti (Jackmann N et al., 2022).

Soggetti sani	223-1276 ng/ml
Soggetti neutropenici	223 ng/ml (valore soglia)

Tabella 1: valori di riferimento per hCAP-18 negli adulti

1.3 Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)

ELISA è l'acronimo di Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (saggio di immunoassorbimento enzimatico). Si tratta di un versatile metodo d'analisi immunologica che rientra nella categoria dei test immunoenzimatici.

In questo tipo di saggio analitico, una sostanza da dosare (definita analita) si lega ad un'altra (generalmente rappresentata da un anticorpo) che ne rileva la presenza. Il metodo ELISA ha come fine il rilevamento

e l'identificazione (sia qualitativa che quantitativa) di una sostanza specifica all'interno di un campione.

Prima del suo sviluppo, l'unica opzione per condurre un saggio immunologico era riconducibile ad una tecnica che utilizza antigeni o anticorpi marcati radioattivamente. Poiché la radioattività pone una potenziale minaccia per la salute, il test ELISA ha rappresentato un'alternativa più sicura.

Il test ELISA si basa sull'utilizzo di anticorpi marcati con un enzima (generalmente la perossidasi), in modo che i coniugati risultanti abbiano una attività sia immunologica che enzimatica. Avendo uno dei componenti (antigene o anticorpo) adeso alla piastra, la reazione antigene-anticorpo è immobilizzata e pertanto potrà facilmente essere evidenziata con l'aggiunta del substrato che, reagendo con l'enzima, produrrà una colorazione osservabile a vista e quantificabile con lo spettrofotometro (Centorrino F, 2023).

Esistono quattro tipi o categorie di test ELISA:

- Nel test ELISA *diretto*, l'antigene è adeso alla base del supporto solido e la sua presenza può essere rilevata attraverso l'utilizzo di un anticorpo marcato con un enzima che, se fatto reagire con un opportuno substrato, permette l'osservazione di un complesso (prima incolore) che produrrà una colorazione apprezzabile. In linea generale, lo sviluppo del colore è indicativo della presenza dell'antigene che si vuole saggiare e l'intensità della colorazione è semi-quantitativa e misurabile attraverso l'uso dello spettrofotometro.
- La procedura, del test ELISA *indiretto*, implica l'uso di un anticorpo secondario marcato che sia in grado di riconoscere la regione costante dell'anticorpo primario, precedentemente incubato in fase solida. In

questa metodica, a differenza di quella descritta precedentemente, è importante determinare la presenza di un determinato anticorpo.

- In un saggio ELISA a *sandwich*, vengono utilizzati due anticorpi specifici per due epitopi diversi sull'antigene bersaglio. L'anticorpo di cattura viene immobilizzato sul fondo del pozzetto della micropiastra e si lega a un epitopo dell'antigene. L'anticorpo di rilevazione, che è coniugato a un enzima che permette di determinarne la presenza, si lega a un diverso epitopo dell'antigene.
- In un saggio ELISA *competitivo*, un antigene di riferimento viene immobilizzato sul fondo del pozzetto della micropiastra. Quindi vengono aggiunti nel pozzetto il campione e l'anticorpo cosicché l'eventuale antigene presente nel campione compete con l'antigene di riferimento per il legame all'anticorpo. Il materiale non legato viene eliminato mediante lavaggio. Rispetto alle precedenti metodiche, quanto maggiore è la quantità di antigene presente nel campione, tanto minore sarà la quantità di anticorpo che si lega all'antigene di riferimento sul fondo del pozzetto e quindi tanto inferiore sarà il segnale.

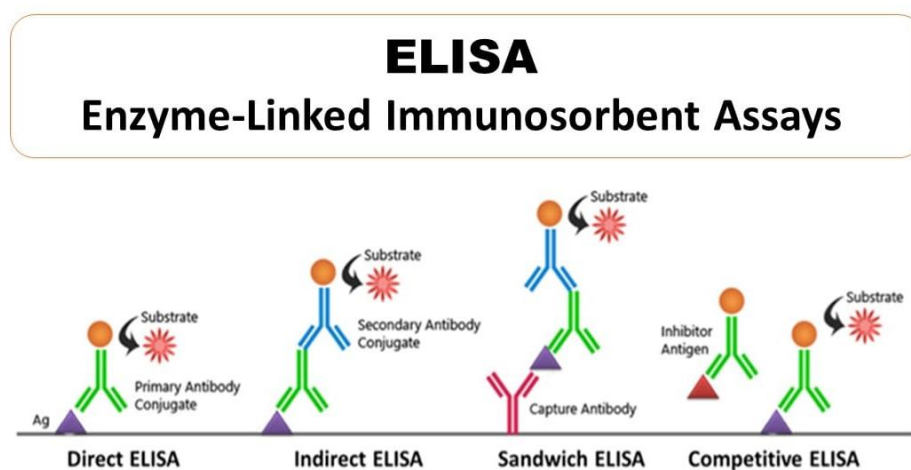


Figura 3: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

La scelta del tipo più adatto di saggio ELISA dipende dalla complessità dei campioni da testare e dagli anticorpi e/o antigeni specifici disponibili per l'uso. Il test *indiretto* viene spesso utilizzato per determinare l'esito di una risposta immunologica come la misurazione della concentrazione di un anticorpo in un campione. I test *diretto* e a *sandwich* sono più adatti per l'analisi di campioni complessi e misti. Il test *competitivo* è usato quando è disponibile un solo anticorpo per rilevare l'antigene di interesse (Vaccaretti M, 2023).

I test ELISA, combinando la specificità di un anticorpo con la sensibilità dei test enzimatici, danno origine a un'ampia varietà di applicazioni, tra cui la ricerca clinica, forense e alimentare. I test ELISA vengono ampiamente utilizzati per rilevare e quantificare molecole come ormoni, peptidi, anticorpi e proteine; si usa per quantificare molecole contenute in vari campioni, compresi siero, plasma, urina, saliva o estratti di tessuto (Centorrino F, 2023).

Il vantaggio principale è l'alta sensibilità e specificità diagnostica. Attraverso il test ELISA, però, sono ottenibili soltanto informazioni riguardanti la presenza o meno di determinate molecole nel nostro campione: questo è uno svantaggio notevole, soprattutto quando si vuole analizzare e caratterizzare biochimicamente ciò che il saggio ha rilevato.

1.4 Lo spettrofotometro

Lo spettrofotometro è un'apparecchiatura che viene utilizzata per misurare l'assorbanza di una soluzione a diverse lunghezze d'onda della luce. Oltre alla misura di assorbimento di luce da parte di una sostanza, possono essere fatte anche misure sulla concentrazione attraverso analisi: qualitative, sulla presenza o meno di una determinata sostanza caratterizzata da uno specifico spettro di assorbimento; semi-

quantitative, mettendo in rapporto le concentrazioni stimate di diversi campioni definendo quelle più ricche o povere di una determinata sostanza; quantitative, ovvero la stima del contenuto di una certa molecola. In quest'ultimo caso è necessario compilare una curva di calibrazione e avere a disposizione degli standard con una concentrazione nota, così da poterli mettere in relazione con i dati ottenuti.

Lo spettrofotometro è costituito generalmente da una fonte di luce, una lampada, che cambia tipologia in caso si tratti delle analisi nello spettro visibile o UV e, in alcuni strumenti specifici, i raggi infrarossi. La luce passa, successivamente, attraverso un monocromatore, ovvero un dispositivo che scompone la luce policromatica in fasci di luce di singole lunghezze d'onda. Poi il raggio di luce passa da una provetta contenente il campione, la cuvetta; quest'ultima è di misura standard e prodotta di materiale plastico o quarzo, a seconda delle radiazioni da valutare. Il raggio luminoso che entra nel campione sarà differente da quello in uscita perché in parte è stato assorbito. Alla fine è posizionato un fotometro che rileva la quantità di fotoni che sono stati assorbiti e manda le informazioni al display dello strumento o a un pc. Lo strumento può fare delle misure in un intervallo di lunghezze d'onda, dare il dato richiesto a una sola lunghezza d'onda impostata o analizzare tutto lo spettro d'assorbimento.

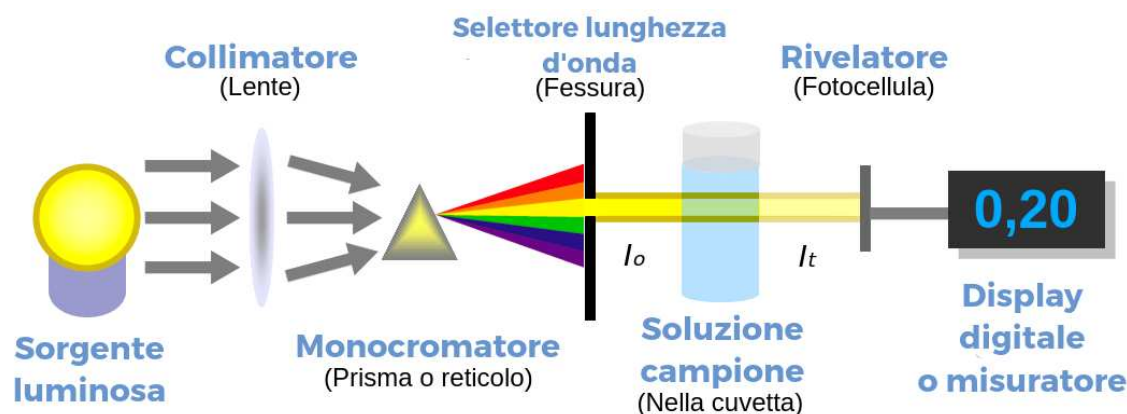


Figura 4: componenti di uno spettrofotometro

È fondamentale, prima di effettuare le analisi sui campioni, andare ad utilizzare delle cuvette con il “bianco” (cuvetta con soluzione senza molecole d’analizzare), così da poter tarare lo spettrofotometro allo zero di assorbanza.

I limiti dipendono dal modello di spettrofotometro e dalle sue caratteristiche specifiche e sensibilità ma anche dalla precisione dell’operatore nelle operazioni precedenti all’analisi stessa. È importante che le cuvette siano perfettamente pulite nei lati dove passa la luce per evitare fenomeni di assorbimento o riflessioni di luce errati. Per di più è necessario conoscere la lunghezza d’onda della luce assorbita dalle molecole che si stanno cercando così da poter impostare lo strumento nella maniera corretta, nel caso di analisi a singola lunghezza d’onda. Nel caso in cui la composizione del campione sia ignota si può osservare lo spettro totale e, successivamente, analizzare i singoli picchi nel grafico per determinare le molecole presenti (Centorrino F, 2022).

Legge di Lambert-Beer

L'assorbanza è direttamente proporzionale alla concentrazione del campione mediante la legge di Lambert-Beer:

$$A = \epsilon bc$$

ϵ : Coefficiente di estinzione molare ($\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$)

b : Cammino ottico (generalmente 1 cm)

c : Concentrazione (mol/L)

Figura 5: legge di Lambert-Beer

2. SCOPO DELLA TESI

La mancanza di neutrofili circolanti, neutropenia, solleva sempre preoccupazioni in quanto rende i pazienti suscettibili a infezioni che possono mettere a rischio la loro vita. Lo stato neutropenico può insorgere intrinsecamente a causa della diminuzione da parte del midollo osseo di produrre neutrofili, o ad un aumento della loro distruzione periferica o ad un aumento del sequestro da parte dei tessuti, ma può anche essere causato da fattori estrinseci quali infezioni, chemioterapia e l'uso di alcuni farmaci. La prevalenza della neutropenia, numero di neutrofili circolanti $< 1.5 \times 10^9/L$ di sangue, è stimata all'1% in una determinata popolazione. La prevalenza può essere maggiore nei discendenti di alcune aree geografiche, sebbene questo tipo di neutropenia costituzionale/etnica non sia collegata ad un aumento del rischio di infezioni.

La neutropenia non è una condizione clinica insolita nei bambini, e quando la durata della neutropenia supera i tre mesi, è classificata come cronica. La causa alla base della neutropenia cronica può variare da malattia grave, come la neutropenia congenita grave (SCN), a neutropenia benigna e transitoria causata principalmente da anticorpi specifici dei neutrofili come nella neutropenia autoimmune (AIN). A causa di questa notevole differenza nella gravità clinica, risulta essenziale distinguere tra i diversi tipi di neutropenia nella fase iniziale per un trattamento più accurato, ma anche per la gestione della malattia stessa. Una anamnesi medica e familiare, nonché l'emocromo completo alla visita medica iniziale potrebbero essere sufficienti per stabilire una diagnosi. Tuttavia, è chiaro da molte evidenze scientifiche che la diagnosi differenziale può essere impegnativa, per cui vengono spesso eseguite indagini approfondite e invasive anche in casi con neutropenia benigna, che causa sia stress al paziente, ma anche utilizzo di risorse eccessive e costose.

La ricerca clinica si sta indirizzando verso la ricerca di marcatori plasmatici presenti nella forma grave della malattia che potrebbero essere facilmente applicati nell'iter clinico.

In uno studio iniziale è stato proposto che i livelli plasmatici della proteina hCAP 18, chiamata anche pro-LL-37 o catelicidina-LL-37, o ancora pro-proteina del peptide antimicrobico LL-37, potrebbero essere utilizzati per differenziare i casi gravi di neutropenia da quelli benigni. Infatti, in questi studi, i livelli di hCAP-18 erano bassi o non rilevabili nella SCN mentre le forme meno gravi di neutropenia mostravano livelli facilmente rilevabili.

A seguito di questi studi, dal 1 febbraio 2018 in Svezia il dosaggio dell'hCAP-18 (Pro-LL-37) è stato inserito nelle linee guida per la gestione della neutropenia come ulteriore biomarcatore plasmatico nella diagnosi differenziale della neutropenia. Sempre in Svezia è stato sviluppato e validato un test ELISA per la rilevazione di hCAP-18 utilizzando reagenti disponibili in commercio (Mörtberg A et al., 2021).

Nel presente progetto di tesi si è voluta mettere in luce la capacità del metodo ELISA nella quantificazione della proteina antimicrobica umana 18 kDa (hCAP-18) derivante dai neutrofili al fine di un suo utilizzo come strumento di screening per la neutropenia cronica. Di fatto, in commercio non vi è una piastra ELISA che consenta, oltre alla diagnosi, di seguire il paziente neutropenico nel suo decorso di malattia. Si sono voluti prendere in esame pazienti di età pediatrica, con l'obiettivo ultimo di riuscire a discriminare i casi in cui la neutropenia, situazione non insolita nel bambino, evolva verso la patologia e quindi verso la cronicità (Mörtberg A et al., 2021).

Quindi, il nostro studio ha voluto dimostrare e proporre l'utilità dell'utilizzo di una piastra ELISA validata per l'analisi dell'hCAP-18, in

modo da confermare il dato secondo cui i pazienti neutropenici, mostrano una diminuzione dei livelli di hCAP-18 rispetto ai controlli sani.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Arruolamento dei soggetti

Nel presente studio sono arruolati soggetti di controllo e soggetti neutropenici afferenti alla SOSD di Oncoematologia Pediatrica dell'Ospedale Pediatrico Salesi di Ancona (AOU), ed anche il personale della SOSD.

I valori di cut off per definire uno stato di neutropenia sono stati una conta assoluta di neutrofili $< 1.5 \times 10^9/L$.

Tutti i soggetti, o un loro familiare se minorenni, hanno dato il consenso informato prima del prelievo di sangue venoso periferico.

3.2 Preparazione del plasma ricco in piastrine (PRP)

Il prelievo di sangue venoso periferico è stato effettuato dopo 12 ore di digiuno, e poi immediatamente unito all'anticoagulante ACD (36 ml acido citrico, 5 mmol/L KCl, 90 mmol/L NaCl, 5 mmol/L glucosio, 10 mmol/L EDTA, pH 6.8). Il sangue è stato centrifugato a $200 \times g$ per 10 minuti e stoccato a $-80^\circ C$ se non utilizzato.

3.3 ELISA hCAP-18

3.3.1 Reagenti

Il test ELISA hCAP-18 è stato concepito come un sandwich ELISA, utilizzando come anticorpo di cattura anticorpi anti-hCAP18 monoclonali di topo (clone H7, Thermo Fisher) e come anticorpo di rilevamento anticorpi anti-hCAP18 policlonale di coniglio (OSC0000W, Thermo Fisher) con aggiunta di IgG di topo (SC-2025 Santa Cruz). Lo standard di calibrazione è la proteina ricombinante hCAP-18 (cAMP, 34-173 aa, PAT82020-1, Nordic Biosite). Per il rilevamento delle IgG di coniglio legate è stato utilizzato l'anticorpo anti-coniglio coniugato con horse radish peroxidase (HRP)

(Jackson ImmunoResearch) e il substrato di rilevamento (TMB One, Kem- en-Tec Nordic).

3.3.2 Preparazione delle soluzioni

- *Tampone di lavaggio (Wash Buffer - WB)*: è la soluzione salina tamponata con fosfato (PBS) (14190-094, Thermo Fisher) con Triton-X-100 all'1% (Sigma-Aldrich). Si è utilizzato Dulbecco's PBS senza calcio e magnesio (-Ca e -Mg). La soluzione è stata diluita e poi vortexata; una volta aperta è stata conservata a 4 °C.

- *Tampone di bloccaggio (Blocking Buffer - BB)*: è il PBS con 1% di Triton-X-100 e 1% di albumina di siero bovino (BSA) (A-7906, Sigma-Aldrich); viene utilizzato anche come tampone di diluizione per campioni e reagenti. La BSA è stata pesata direttamente in eppendorf/falcon ed è poi stato calcolato il volume di WB da aggiungere. Il BB viene sempre preparato fresco ed è quindi nuovo ad ogni analisi.

- *Standard (ALLEGATO 1)*: è aliquotato e conservato a -80 °C. Per ogni analisi viene scongelato e diluito in BB. L'hCAP-18 ricombinante è stato utilizzato per ottenere sette concentrazioni *standard* utilizzando sei fasi di diluizioni seriali triple a partire dalla soluzione stock di 100 ng/mL, fornendo un intervallo di analisi di 0.41-100 ng/ml. Le sette concentrazioni standard utilizzate sono le seguenti: 0.41 ng/ml (S1); 1.23 ng/ml (S2); 3.7 ng/ml (S3); 11.1 ng/ml (S4); 33.3 ng/ml (S5); 66.7 ng/ml (S6); 100 ng/ml (S7).

- *Campioni a concentrazioni note*: sono preparati dalla soluzione standard, da utilizzare almeno uno per ogni analisi e sono diluiti in BB. Nello specifico, quando viene preparato lo standard per la curva, si ricava il campione a concentrazione nota (C40): la sua concentrazione è circa a metà della curva standard, ovvero a 40 ng/ml.

- Nello studio sono stati utilizzati *campioni di plasma* diluiti 1:10 in BB.

- *Anticorpo monoclonale*: viene aliquotato e conservato a -20 °C. Prima di ogni analisi viene scongelato e diluito ad una concentrazione di 5 µg/ml con PBS.
 - *Antibody mix*: è costituito da anticorpo policlonale diluito e IgG di topo; l'anticorpo policlonale è diluito 1:1500 e sono aggiunti 13 µl/ml di IgG di topo (diluito in BB). L'anticorpo policlonale è aliquotato e conservato a -20 °C; le IgG di topo sono conservate a 4 °C.
 - *Anticorpo secondario HRP-coniugato*: è aliquotato e conservato a -80 °C. Per ogni analisi si scongela e si diluisce 1:10000 in BB.
 - *Substrato (TMB)*: si conserva a 4 °C e viene portato a temperatura ambiente circa due ore prima dell'utilizzo. All'inizio dell'analisi si mette in eppendorf/falcon il volume che verrà utilizzato e, fino al suo utilizzo, si conserva al buio.
- Per interrompere la reazione, e permettere quindi di andare a misurare la densità ottica con lo spettrofotometro, si utilizza *acido solforico* 0,2 M.

3.3.3 Protocollo ELISA hCAP-18

Giorno 1: preparazione piastra

1. Preparare il BB in quantità necessaria per diluire l'anticorpo monoclonale.
2. Scongellare l'aliquota di anticorpo monoclonale e diluirlo con PBS.
3. “Coprire” (coat) una piastra MaxiSorp (Nunc, Thermo Fisher) con 100 µL dell'anticorpo di cattura monoclonale di topo anti-hCAP-18 (clone H7), ad una concentrazione di 5 µg/mL in PBS.
4. Ricoprire la piastra con parafilm ed incubare per una notte a +4 °C.

Giorno 2: analisi

1. Preparare il BB necessario per tutta l'analisi.
2. Lavare la piastra tre volte con 300 µl di WB. Tutte le fasi di lavaggio successive vengono eseguite allo stesso modo.

3. Dopo la fase di lavaggio, aggiungere 300 μ l di BB ed incubare per almeno 1 ora (=1.15 h) a temperatura ambiente (RT).
4. Portare a RT il volume necessario di substrato, e mantenerlo coperto dalla luce.
5. Preparare le diluizioni degli standard di calibrazione, il campione a concentrazione nota e le diluizioni 1:10 dei campioni da dosare. Diluire i campioni da analizzare con il BB.
6. Lavare nuovamente la piastra tre volte con 300 μ l di WB per ogni pozzetto.
7. Aggiungere in duplicato 100 μ l di BB (bianco), di ciascun standard e campione, rispettivamente, ed incubare per 1 ora a RT.
8. Preparare l'antibody mix: l'anticorpo policlonale anti-hCAP-18 di coniglio viene scongelato e poi diluito 1:1500; vengono aggiunti 13 μ L/mL di IgG di topo normale (SC-2025).
9. Lavare nuovamente la piastra tre volte con 300 μ l di WB per ogni pozzetto.
10. Aggiungere 100 μ l della miscela di anticorpi (antibody mix) ed incubare la piastra per 1 ora a RT.
11. Scongelare l'aliquota di anticorpo secondario coniugato. Dopo il lavaggio, aggiungere 100 μ l di anticorpo secondario coniugato con HRP diluito 1:10.000 ed incubare la piastra per 30 minuti a RT.
12. Dopo il lavaggio, aggiungere 100 μ l di substrato ed incubare a RT al buio. Fermare la reazione aggiungendo 100 μ l di acido solforico 0.2 M ad ogni pozzetto, dopo 15 minuti.
13. Misurare la densità ottica a 450 nm con 570 nm come riferimento di fondo. Utilizzare la funzione logistica a 4 parametri per l'adattamento della curva e per la determinazione delle concentrazioni incognite.

3.3.4 Costruzione della curva standard

La curva di taratura si ottiene utilizzando lo standard commerciale (catelicidina) per l'hCAP-18. Si utilizzano 8 pozzetti (in doppio) della piastra in modo da ottenere il bianco di riferimento e 7 punti della retta a concentrazioni comprese tra 0.41 e 100 ng/ml. Sulla base dei dati ottenuti viene costruita la curva di taratura 4-parameters e ricavata l'equazione che verrà poi utilizzata per ottenere la concentrazione di hCAP-18 nei campioni biologici incogniti.

I risultati che si otterranno, dallo sviluppo della metodica ELISA hCAP-18, si riferiscono ad un campione a concentrazione nota (C40) preparato dallo standard, sei campioni neutropenici ed otto campioni controllo, letti in doppio.

Lo spettrofotometro legge la piastra ELISA tre volte:

La prima lettura fornisce i dati ad una lunghezza d'onda di 450 nm (test a 450 nm).

	1	2	3	4	5	6	
A							450 [Test]
B							450 [Test]
C							450 [Test]
D							450 [Test]
E							450 [Test]
F							450 [Test]
G							450 [Test]
H							450 [Test]

Tabella 2: Lettura Test dello spettrofotometro a 450 nm

La seconda lettura, effettuata a 570 nm, ha lo scopo di verificare se vi siano sostanze che interferiscono.

	1	2	3	4	5	6	
A							570 [Ref]
B							570 [Ref]
C							570 [Ref]
D							570 [Ref]
E							570 [Ref]
F							570 [Ref]
G							570 [Ref]
H							570 [Ref]

Tabella 3: Lettura Test dello spettrofotometro a 570 nm

La terza lettura, a 450 nm, ci fornisce i dati cui facciamo riferimento.

	1	2	3	4	5	6	
A							450
B							450
C							450
D							450
E							450
F							450
G							450
H							450

Tabella 4: Lettura dello spettrofotometro a 450 nm

Nello specifico, le colonne 1 e 2 sono state utilizzate per ottenere la curva standard: nella riga A vi è il bianco, mentre nelle restanti sette righe (da B ad H) vi sono gli standard con concentrazioni crescenti (0.41-100 ng/ml). I valori del campione a concentrazione nota C40 sono rispettivamente nei pozzetti A3 e A4 della piastra ELISA. Per quanto riguarda i sei campioni neutropenici, li troviamo nelle colonne 3 e 4, dalla riga B alla G. Gli otto campioni controllo sono stati anch'essi letti in doppio nei pozzetti H3, H4 e nelle colonne 5 e 6 della piastra.

La curva ottenuta, riportata di seguito, è una curva 4-parameters, quindi una curva che prende in modo preciso tutti i valori dello standard.

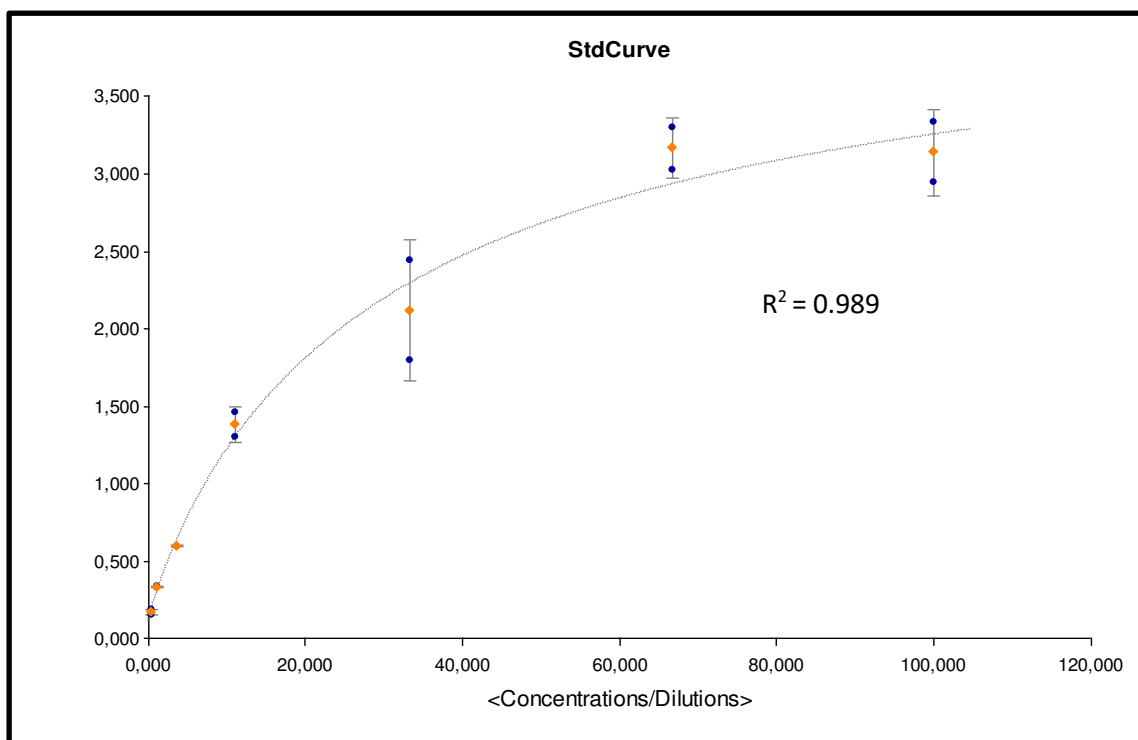


Figura 6: grafico curva standard 4-parameters

R^2 = parametro di affidabilità; più il suo valore è elevato (si avvicina ad 1) e più la curva è affidabile.

La seguente equazione, ricavata dalla curva 4-parameters, mette in relazione l'assorbanza con la concentrazione.

$$y = d + \frac{a - d}{1 + \left(\frac{x}{c}\right)^b}$$

L'equazione che è stata utilizzata per trovare la concentrazione è la seguente (equazione inversa della precedente ricavata dalla curva 4-parameters):

$$x = c \left(\frac{a - d}{y - d} - 1 \right)^{\frac{1}{b}}$$

a = minimo

d = massimo

c = flesso

b = pendenza

y = assorbanza

x = concentrazione

3.4 Western Blot

3.4.1 Preparazione dei campioni per il Western Blot e determinazione del contenuto proteico secondo la metodica del Bradford

Prima di caricare i campioni questi devono essere quantificati tramite il saggio di Bradford (quantificazione delle proteine totali) (Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976; 72:248-254). Nei pozzetti del gel poi andrà caricato un Volume totale di 20µl contenente una quantità pari a 50µg/µl di proteine.

- I campioni sono stati diluiti 1:15.
- Sono state preparate sei diluizioni di BSA, utilizzata come standard.

0 → 500µl di H₂O + 500µl di Bradford

20 → 480µl di H₂O + 20 µl di BSA + 500µl di Bradford

40 → 460µl di H₂O + 40 µl di BSA + 500µl di Bradford

60 → 440µl di H₂O + 60 µl di BSA + 500µl di Bradford

80 → 420µl di H₂O + 80 µl di BSA + 500µl di Bradford

100 → 400µl di H₂O + 100 µl di BSA + 500µl di Bradford

Per i campioni 500µl di H₂O + 1 o 2 µl di campione + 500µl di Bradford

- È stata misurata l'assorbanza allo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 595nm.
- È stata tracciata una retta standard utilizzando l'assorbanza letta dalla BSA.
- Tramite la retta standard, è stata calcolata la concentrazione di proteine dei campioni e quindi i µl da prelevare per avere 50µg/µl di proteine totali. Nei pozzetti sono stati caricati 15µl di campione e 5µl di Sample Buffer

(SB), composto da TrisHCl 250 mM pH 6.8, SDS 8%, glicerolo 40%, β -mercaptoetanol 20% e blu di bromofenolo 0.4%.

- I campioni sono stati poi bolliti a 95 °C per 3 minuti nel termoblocco, con lo scopo di denaturare le proteine e permetterne quindi la corsa tra le maglie di acrilammide.

- I campioni così preparati sono stati conservati a -20 °C; poi sono stati caricati nei rispettivi pozzetti del gel di poliacrilammide, insieme allo standard (catelicidina). Quest'ultimo è stato aggiunto per identificare la banda specifica corrispondente ai 18kDa, peso molecolare dell'hCAP-18.

La concentrazione dei campioni è stata ricavata dalla retta standard, calcolata in base ai valori di assorbanza ottenuti dalla lettura dei campioni a 595nm. La concentrazione ottenuta è stata moltiplicata per 15 (fattore di diluizione 1:15), in modo da trovare la concentrazione proteica effettiva di ogni campione.

L'equazione della retta è $y = mx + q$ dove l'asse delle ascisse è rappresentato dalla concentrazione e l'asse delle ordinate dall'assorbanza. Per ottenere i rispettivi valori di concentrazione si è quindi utilizzata l'equazione inversa: $x = \frac{y-q}{m}$.

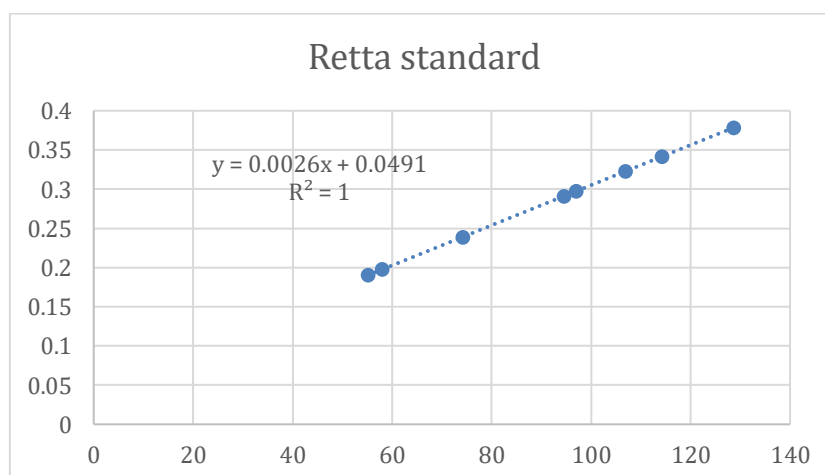


Figura 7: Retta Standard

3.4.2 Protocollo Western Blot

- È stato preparato il running gel, utilizzando H₂O, acrilammide 30%, Tris-HCl 1.5M pH8.8, SDS 10%, APS 5% e TEMED (seguendo quest'ordine).
- Il running gel è stato versato all'interno dei vetrini e lasciato polimerizzare per 30 minuti.
- È seguita poi la preparazione dello stacking gel, composto da H₂O, acrilammide 30%, Tris-HCl 1M pH6.8, SDS 10%, APS 5% e TEMED (seguendo quest'ordine).
- È stato versato lo stacking gel al di sopra del running gel; una volta inserito il pettinino, l'attesa per la polimerizzazione è stata di 90 minuti.
- Ottenuta la polimerizzazione, il gel è stato posizionato nella camera elettroforetica, riempita poi con il Laemmli.
- Sono stati caricati i pozzetti con 5 µl di marker e 20 µl di standard e di campioni, con la pipetta Hamilton.
- È stata avviata la corsa elettroforetica, e mantenuta, a 100V.
- Terminata la corsa, si è estratto il gel dalla camera elettroforetica, si sono condizionate le membrane e si è preparato il sandwich.
- Si è posizionato il sandwich nella camera per trasferimento, riempita con il Caps (tampone di trasferimento al 10% di metanolo).
- È stato eseguito il trasferimento a 4 °C, per 30 minuti a 250 mA.
- Terminato il trasferimento, la membrana è stata posta in una Falcon e incubata con una soluzione di bloccaggio per 10 minuti. Sono poi stati eseguiti 3 lavaggi ed infine aggiunto l'anticorpo primario.
- È seguita quindi l'incubazione con l'anticorpo primario overnight (ON), in agitazione a 4 °C.
- Dopo l'incubazione ON, sono stati eseguiti 5 lavaggi e poi è stata aggiunta la soluzione di anticorpo secondario, incubato in agitazione, per 90 minuti.

- Al termine dell'incubazione, sono seguiti 5 ulteriori lavaggi da 5 minuti. La metodica è giunta a conclusione con lo sviluppo dei risultati; la soluzione di sviluppo utilizzata contiene luminolo (Super-Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrate: Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), substrato della perossidasi di rafano (enzima coniugato all'anticorpo secondario). È stata così ottenuta una reazione che produce una chemiluminescenza letta dallo strumento ChemiDoc XRS+ System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

4. RISULTATI

I valori della curva 4-parameters, che ci fornisce lo strumento, sono stati utilizzati per calcolare le concentrazioni.

Curve Name	Curve Formula	A	B	C	D	R ²
StdCurve	$Y = (A - D) / (1 + (X/C)^B) + D$	0.102	0.913	30.7	4.33	0.989

Tabella 5: Valori della curva 4-parameters

			dil 1:10
Samples	Abs	4-par	C (ng/ml)
C40	2.389	36.7	36.7
N1	0.156	0.3	2.6
N2	0.131	0.1	1.3
N3	0.333	1.3	13.5
N4	0.691	4.2	41.7
N5	0.375	1.6	16.4
N6	0.141	0.2	1.8
1	1.012	7.4	74.4
2	0.916	6.4	63.8
4	0.817	5.4	53.7
5	0.958	6.8	68.4
6	1.148	9.1	90.7
9	0.866	5.9	58.6
10	0.524	2.8	27.6
11	0.444	2.1	21.4

Tabella 6: Lettura e concentrazione del campione C40, dei campioni neutropenici e dei campioni di controllo

La tabella 6 fa riferimento al campione a concentrazione nota (C40), ai campioni neutropenici (N1-N6) ed ai campioni controllo (1, 2, 4, 5, 6, 9, 10, 11).

Nella colonna Abs sono stati riportati i valori dell'assorbanza letta con lo spettrofotometro.

La colonna 4-par riporta la concentrazione di hCAP-18 calcolata utilizzando l'equazione della curva 4-parameters ($y = d + \frac{a-d}{1+(\frac{x}{c})^b}$).

La colonna C mostra il calcolo delle concentrazioni effettive, cioè quelle calcolate con la curva 4-parameters e poi moltiplicate per 10, in quanto i campioni, come da protocollo ELISA, sono stati diluiti 1:10.

Il campione C40 che dovrebbe essere ad una concentrazione di 40 ng/mL risulta aver letto di poco al di sotto di questo valore (36.7 ng/mL).

I campioni neutropenici risultano aver tutti letto meno dei valori di controllo ad eccezione del campione N4.

Nella Tabella 7 sono riportati i valori di concentrazione di hCAP-18 in campioni controllo.

dil 1:10
C (ng/ml)
365.1
346.1
209.0
144.0
107.0
144.7
197.1
316.1

Tabella 7: Risultati dei campioni di controllo

Come si può riscontrare dai risultati ottenuti, questi valori sono ben al di sopra dei valori ottenuti nei pazienti neutropenici.

Nella Tabella 8 sono riportate le concentrazioni di hCAP-18 ottenute dalla metodica ELISA in soggetti di controllo ed in soggetti neutropenici che saranno poi messe a confronto con i risultati ottenuti con la metodica del Western Blot.

	dil 1:10
Samples	C (ng/ml)
C40	51.6
N2	1.1
N3	123
N4	597
N5	84
N14	69
N16	203
N17	2
1	1129
9	433
10	203
11	752
12	612
13	103
15	100

Tabella 8: Risultati ottenuti dalla metodica ELISA

Di questi campioni, una volta ottenuta la concentrazione proteica tramite il saggio del Bradford, è stata ricavata la curva, che ci ha poi

consentito di conoscere in maniera accurata e precisa i μL da prelevare e da caricare nel pozzetto del gel del Western Blot, in modo che abbiano tutti la medesima concentrazione iniziale.

Samples	Abs	Conc. ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	μl da prendere per 100 ng
1	0.3787	128.75	7.8 (dil 1:10)
9	0.3415	114.22	8.8 (dil 1:10)
10	0.2976	97.07	10.3 (dil 1:10)
11	0.3228	106.91	9.4 (dil 1:10)
N2	0.239	74.18	13.5 (dil 1:10)
N3	0.2913	94.61	10.6 (dil 1:10)
N4	0.1904	55.2	3.62 (dil 1:2)
N5	0.1977	58.05	3.44 (dil 1:2)

Tabella 9: Concentrazione proteica dei campioni per la preparazione per il Western Blot

Dopo aver seguito e portato a termine il protocollo del Western Blot, abbiamo ottenuto le bande come riportato nelle Figura 8 e 9.

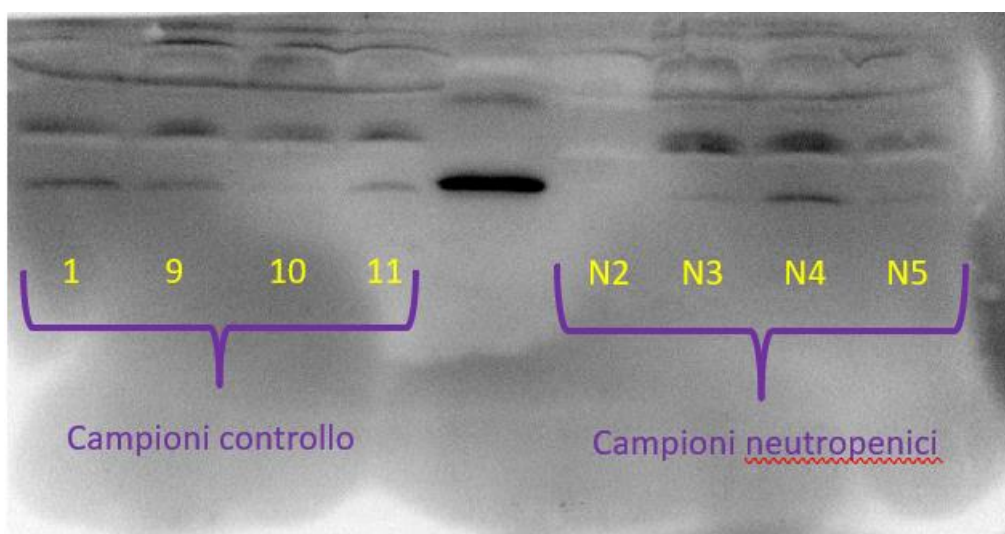


Figura 8: Western Blot dei campioni di controllo e neutropenici

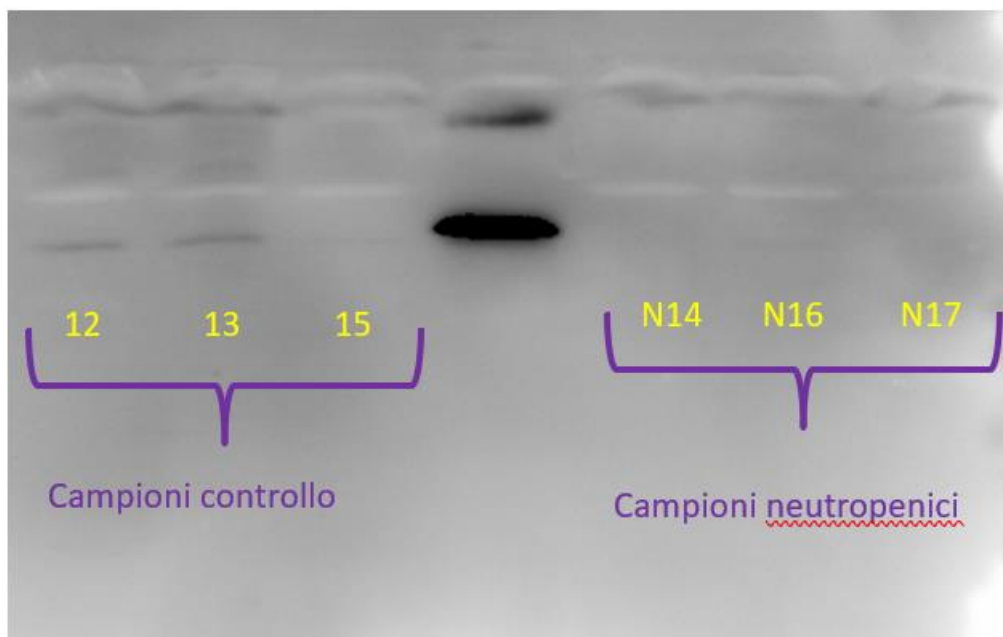


Figura 9: Western Blot dei campioni di controllo e neutropenici

Come si può vedere dalla colorazione delle bande del Western Blot, ad eccezione del campione neutropenico N4, tutti gli altri campioni di neutropenici hanno una intensità di banda inferiore, e talora impercettibile, rispetto alla colorazione delle bande dei campioni di controllo, che risultano più marcate.

5. DISCUSSIONE

I risultati ottenuti dal saggio ELISA, riportati nelle Tabelle 6 e 7, non hanno mostrato la corrispondenza aspettata, rispetto a quanto descritto nel lavoro di Mortberg A. et al., 2021 (The blood protein hCAP-18 in neutropenia: An 18-month experience of a new ELISA for clinical use). Nella tabella 6, per il campione a concentrazione nota C40 è stata ottenuta una concentrazione pari a 36.7 ng/ml; di fatto, leggermente al di sotto di quella attesa di 40.0 ng/ml. Invece, per i sei campioni neutropenici (N1–N6), la concentrazione di hCAP-18 è risultata essere inferiore a quella mostrata dai campioni controllo (1, 2, 4, 5, 6, 9, 10, 11) tranne che per il campione N4, che ha mostrato un valore di 41.7 ng/ml, addirittura più elevato di alcuni controlli (10, 11) ed anche di quanto ci si aspettasse da un campione di un soggetto con neutropenia.

I problemi di concordanza tra risultati, come accennato, si mettono ulteriormente in evidenza quando si vanno a confrontare le concentrazioni di hCAP-18 in diverse sessioni di analisi, come mostrato nelle Tabelle 6 e 7. Pur avendo mantenuto la diluizione 1:10, come suggerito dai ricercatori del Karolinska Institute nel loro lavoro (Mortberg A. et al., 2021), la concentrazione di hCAP-18 nei controlli è risultata essere differente rispetto ai valori ottenuti dagli autori, ma differente anche nelle diverse sessioni di analisi (Tabelle 6 e 7). Quindi quello che viene meno è la possibile ripetibilità del test, ovvero il grado di concordanza tra una serie di misure di uno stesso misurando (la grandezza oggetto di misurazione), quando le singole misurazioni sono effettuate in momenti diversi.

Il nostro studio, inoltre, si è avvalso dell'utilizzo del Western Blot che, come l'ELISA, è una metodica utilizzabile per analizzare le proteine presenti in un campione biologico. Nello specifico, l'ELISA è una metodica quantitativa, mentre il Western Blot è un metodo di analisi

qualitativo/semi-quantitativo. Quindi, il Western Blot è stato eseguito per avere un riscontro, ovvero per valutare se effettivamente la proteina hCAP-18 è presente in maggior quantità nei campioni di controllo rispetto ai campioni neutropenici.

Effettivamente, nelle Figure 8 e 9, relative a due diversi Western Blot, i campioni che presentano le bande più sottili, e quindi poco visibili, sono quelle dei campioni neutropenici (ad eccezione del campione N4 che però risulta avere una concentrazione di hCAP-18 maggiore), mentre i campioni controllo mostrano bande più spesse e colorate. Inoltre, andando a fare un confronto con i risultati ottenuti attraverso il test ELISA riportati in Tabella 8, i campioni con basse concentrazioni di hCAP-18 (ng/ml) mostrano anche bande più sottili nei risultati del Western Blot. Allo stesso tempo, i campioni che hanno una concentrazione di hCAP-18 maggiore al test ELISA hanno anche una colorazione di banda più intensa al Western Blot. Vi è quindi una correlazione tra i risultati ottenuti attraverso le due differenti metodiche che rilevano la presenza di specifiche proteine bersagli; il saggio ELISA e il Western Blot.

6. CONCLUSIONI

Il presente studio è stato condotto con l'intento di andare a quantificare un biomarcatore plasmatico, la proteina dei granuli dei neutrofili definita pro-LL-37 (hCAP-18 o cathelin-LL-37) che nel plasma riflette l'attività mielopoietica del midollo osseo per facilitare la diagnosi precoce. Infatti, la quantificazione di tale marcatore potrebbe aiutare nella diagnosi differenziale della neutropenia cronica, ovvero la neutropenia congenita grave, come suggerito da Sorensen et al (Sorensen, O., Cowland, J.B., Askaa, J. & Borregaard, N. (1997) An ELISA for hCAP-18, the cathelicidin present in human neutrophils and plasma. *Journal of Immunological Methods*, 206, 53–59).

I risultati fino ad ora in nostro possesso, sebbene preliminari, ci fanno ben sperare in quanto nelle diverse analisi del Western Blot si vede chiaramente come i campioni dei pazienti pediatrici neutropenici mostrino delle bande sottili e/o del tutto assenti, rispetto ai soggetti di controllo. Ciò va a sostenere la correlazione con i risultati ottenuti attraverso il metodo ELISA, sebbene allo stato attuale non sia possibile l'uso della piastra a livello diagnostico, come strumento di screening nella neutropenia, dal momento che ne manca la ripetibilità.

Quindi, pur essendo i risultati soddisfacenti, saranno necessarie ulteriori prove per confermare i dati ottenuti, su un numero di soggetti più ampio.

7. BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA

- Bartels M, Murphy K, Rieter E, Bruin M. Understanding chronic neutropenia: life is short. *Fr. J Ematolo.* 2016; 172: 157-169.
- Bertelli G. Neutropenia – Analisi del sangue. My personal trainer; 4/2020
<https://www.my-personaltrainer.it/salute-benessere/neutropenia.html>
- Boxer LA. How to approach neutropenia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2012; 2012: 174-182.
- Dale D C, Bolyard A A, Shannon J A et Al. Outcomes for patients with severe chronic neutropenia treated with granulocyte colony-stimulating factor. *Ash Publications;* 7/2022
<https://ashpublications.org/bloodadvances/article/6/13/3861/485070/Outcomes-for-patients-with-severe-chronic>
- Dale D C. Neutropenia – (Agranulocitosi; Granulocitopenia). MD, University of Washington; 4/2023
<https://www.msmanuals.com/it-it/professionale/ematologia-e-oncologia/leucopenia/neutropenia>
- Jackmann N, Englund S, Frisk P, et al. The human cathelicidin hCAP-18 in serum of children with haemato-oncological diseases. *Br J Ematolo.* 2022 Sep; 198(6):1023-1031
- Karlsson J, Carlsson G, Ramme KG, et al. Low plasma levels of the protein pro-LL-37 as an early indication of severe disease in patients with chronic neutropenia. *Br J Haematol.* 2007; 137(2): 166–9
- Mörtberg A, Pütsep K, Höglund P. The blood protein hCAP-18 in neutropenia: An 18-month experience of a new ELISA for clinical use. *Scand J Immunol.* 2021; 94: e13037
- Sørensen O, Arnljots K, Cowland JB, Bainton DF, Borregaard N. The human antibacterial cathelicidin, hCAP-18, is synthesized in myelocytes and metamyelocytes and localized to specific granules in neutrophils. *Blood.* 1997 Oct 1;90(7):2796-803. PMID: 9326247.
- Territo M. Neutropenia – (Agranulocitosi; Granulocitopenia). MD, David Geffen School of Medicine at UCLA; 8/2021
<https://www.msmanuals.com/it-it/casa/disturbi-del-sangue/malattie-dei-globuli-bianchi/neutropenia>
- Ye Y, Carlsson G, Karlsson-Sjoberg JM, et al. The antimicrobial propeptide hCAP-18 plasma levels in neutropenia of various aetiologies: a prospective study. *Sci Rep.* 2015; 5: 11685

- Centorrino F. ELISA: principi delle tecniche immunochimiche ed esempi di saggi. 2023

<https://www.microbiologiaitalia.it/test-microbiologici/elisa-principi-delle-tecniche-immunochimiche-ed-esempi-di-saggi/>

- Saggio di immunoassorbimento enzimatico (ELISA).

<https://it.moleculardevices.com/applications/enzyme-linked-immunosorbent-assay-elisa>

- Vaccaretti M. ELISA, il test immunoenzimatico. 2023.

<https://www.nurse24.it/studenti/indagini-diagnostiche/elisa-test-immunoenzimatico.html>

- Centorrino F. Lo spettrofotometro. 2022.

<https://www.microbiologiaitalia.it/strumentazioni/lo-spettofotometro/>

ALLEGATI

Allegato 1: standard catelicidina hCAP-18

ALLEGATO 1

Nordic BioSite AB
Propellervägen 4A, 183 62 Täby, Sweden
T +46 (0)8 544 433 40, F +46 (0)8 756 94 90
info@nordicbiosite.com, www.nordicbiosite.com
Org. No: 556539-9374, Residence: Täby



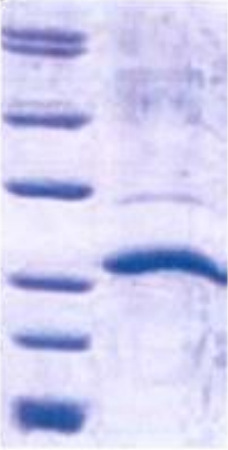
CAMP, 34-173aa, Human, His tag, E.coli (Denatured)

Catalog No. PAT-82020-1

Size 20 ug

Description: CAMP is a member of an antimicrobial peptide family, characterized by a highly conserved N-terminal signal peptide containing a cathelin domain and a structurally variable cationic antimicrobial peptide, which is produced by extracellular proteolysis from the C-terminus. The protein has several functions in addition to antimicrobial activity, including cell chemotaxis, immune mediator induction and inflammatory response regulation. Recombinant human CAMP protein, fused to His-tag at N-terminus, was expressed in *E.coli*.

Product Name	CAMP, 34-173aa, Human, His tag, E.coli (Denatured)
Full Name	Cathelicidin antimicrobial peptide preproprotein
Synonyms:	CAP-18, CAP18, CRAMP, FALL-39, FALL39, HSD26, LL37
NCBI Accession No.	NP_004336.3
Application	SDS-PAGE
Molecular Weight	18.4 kDa (163aa)
Purity	> 90% by SDS - PAGE
Concentration	0.5 mg/ml (determined by Bradford assay)
Form	Liquid. In 20mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) containing 0.4M uREA, 10% glycerol

Storage	Can be stored at +4C short term (1-2 weeks). For long term storage, aliquot and store at -20C or -70C. Avoid repeated freezing and thawing cycles.
Sequences of amino acids:	<p>MGSSHHHHHH SGLVPRGSH MGSQVLSYKE AVLRAIDGIN QRSSDANLYR LLDLDPRTM DGDPTPKPV SFTVKETVCP RTTQQSPEDC DFKKDGLVKR CMGTVTLNQA RGSFDISCDK DNKRFALLGD FFRKSKEKIG KEFKRIVQRI KDFLRNLVPR TES</p>
General Reference	<p>Nijnik,A.,et al. (2012) J. Leukoc. Biol. 91 (4), 599-607 Rosen,G., et al. (2012) Infect. Immun. 80 (3), 1107-1114</p>
Research Category	Immunology
	<p>(kDa)</p>  <p>15% SDS-PAGE (3ug)</p>

8. RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare tutti coloro che mi hanno aiutato nella stesura della tesi con suggerimenti, critiche ed osservazioni: a loro va la mia gratitudine, anche se a me spetta la responsabilità per ogni errore contenuto in questo lavoro. Ringrazio innanzitutto la mia relatrice Prof.ssa Arianna Vignini e la mia correlatrice Dott.ssa Alice Di Paolo, per avermi seguito fin dal primo istante con tanta pazienza nella stesura della tesi, senza mai farmi sentire a disagio per i chiarimenti chiesti. Ringrazio tutti coloro che hanno partecipato e collaborato alla sperimentazione, in particolare la Dott.ssa Valentina Membrino per la sua disponibilità, pazienza e comprensione mostrata. Ringrazio anche la Dott.ssa Sonila Alia, Dott.ssa Valentina Schiavoni, la Dott.ssa Veronica Pompei e il Prof.re Roberto Campagna che si sono dimostrati sin da subito interessati al progetto e disponibili per ogni chiarimento. Vorrei ringraziare tutto il personale della DISCO (Dipartimento di scienze specialistiche cliniche ed odontostomatologiche) per avermi dato la possibilità di procedere per la parte sperimentale della Tesi, per la loro disponibilità e per avermi aiutato a risolvere qualsiasi dubbio. Senza il loro aiuto questo lavoro non sarebbe esistito.

Un grazie anche al personale della SOSD di Oncoematologia Pediatrica dell'Ospedale Salesi di Ancona, Dott.ssa Paola Coccia, Dott.ssa Irene D'Alba e Dott.ssa Lara Antonini ed ai loro piccoli guerrieri, nonché al "progetto G.A.I.A" che ha finanziato l'inizio del progetto.

Un ringraziamento particolare va ai miei amici e colleghi di Università Alice, Melissa, Emma e Ilaria; senza di loro non sarebbe stato lo stesso, mi hanno aiutato a superare ogni ostacolo grazie alle loro risate e alla loro spensieratezza. Infine, vorrei ringraziare me stesso per aver

avuto la determinazione, l'impegno e la dedizione che mi hanno permesso di giungere fino a questo risultato nonostante le difficoltà.