



Università degli studi di Genova

Dottorato XXXI Ciclo

Corso Medicina Interna Clinico-Sperimentale

Curriculum: Malattie autoimmuni e autoinfiammazione, aspetti fisiopatologici e diagnostici

Anno 2015-2018

TESI di DOTTORATO

**Nuove specificità nell'ambito degli Autoanticorpi Antinucleo:  
anticorpi anti-DFS70**

*New Antinuclear Antibodies' specificities:*

*anti-DFS70 antibody*

Candidato: Manuela Marchiano

Relatore: Prof.ssa Giampaola Pesce

Correlatore: Prof.re Marcello Bagnasco

Valutatori: Prof.ssa Loredana Postiglione

Prof.ssa Brunetta Porcelli



## *Indice*

Introduzione.....	4
ANA .....	5
Autoanticorpi anti-DFS70: la scoperta .....	8
L'antigene DFS70/LEDGFp75: struttura e funzione.....	9
Proprietà generali degli autoanticorpi anti-DFS70 e metodi per la loro determinazione.....	14
Correlazioni cliniche degli autoanticorpi anti-DFS70 .....	16
Ruolo degli autoanticorpi anti-DFS70 .....	20
Casistica e Metodi .....	25
Immunofluorescenza Indiretta (IIF) .....	26
Chemiluminescenza (CLIA).....	27
Immunoblot (IB) .....	28
Risultati.....	30
Analisi dei sieri risultati positivi per DFS70, positività totali.....	31
Discussione e Conclusioni .....	33
Bibliografia.....	37



## **Introduzione**

Negli ultimi anni è stata descritta una nuova specificità degli Autoanticorpi Antinucleo (ANA) caratterizzata all'Immunofluorescenza Indiretta su cellule Hep-2 (IIF), da un pattern fluoroscopico definito “dense fine speckled” (DFS) per la fluorescenza finemente granulare del nucleo nelle cellule in interfase e della cromatina nelle cellule in metafase. L'antigene associato a tale quadro fluoroscopico, noto anche come “lens epithelium derived growth factor p75” (LEDGFp75), è una proteina di 70 kD. Da qui deriva l'acronimo DFS70 riferito a tale autoanticorpo che, tra i 28 quadri fluoroscopici identificati dal' International Consensus on ANA patterns ( ICAP), è rappresentato dal quadro di riferimento AC-02. Gli anticorpi anti-DFS70, contrariamente alle altre specificità ANA, sembrano avere una bassa prevalenza nelle malattie reumatiche autoimmuni, mentre ricorrono più frequentemente in individui sani. Inoltre l'antigene da essi riconosciuto ha mostrato interessanti implicazioni nei tumori, nell'infezione da HIV e nei processi infiammatori. Per tali ragioni, fin dalla sua scoperta, questo sistema antigene-anticorpo è stato oggetto di numerosi studi che facessero chiarezza sul suo potenziale ruolo a livello clinico e biologico.

## ANA

La ricerca degli Autoanticorpi Antinucleo (ANA) è stata da tempo convalidata nella diagnostica di laboratorio per le malattie autoimmuni, in quanto consente l'individuazione di autoanticorpi circolanti, diretti contro antigeni cellulari, che costituiscono uno dei criteri patogenetici utilizzati per la definizione dell'origine autoimmune della malattia.

Si tratta di autoanticorpi appartenenti a tutte le classi immunoglobuliniche, ma più spesso di classe IgG, che vengono prodotti come conseguenza della perdita, da parte dell'organismo, della tolleranza verso antigeni self, a causa prevalentemente multifattoriale. Sono infatti diretti verso normali costituenti cellulari (acidi nucleici, proteine associate ad acidi nucleici, enzimi con ruoli chiave nei processi metabolici e loro cofattori, ecc) e riconoscono epitopi cruciali per la funzione molecolare dell'antigene ed evolutivamente molto conservati.

Tuttavia la terminologia con la quale ci si riferisce a tali autoanticorpi, nella sua accezione letterale, risulta ormai impropria e obsoleta: infatti la tecnica dell'immunofluorescenza indiretta (IIF), che tradizionalmente è utilizzata per la loro ricerca, quando viene eseguita su un substrato cellulare come le Hep-2 (linea di carcinoma faringeo umano), consente la rilevazione di più di 50 autoanticorpi rivolti verso antigeni che si trovano non solo nel nucleo ma anche nella membrana nucleare, nell'apparato mitotico, nel citosol, negli organelli citoplasmatici e nella membrana cellulare. Inoltre non tutti i gli antigeni sono strettamente localizzati in un unico compartimento cellulare e la loro funzione e relativa concentrazione nei diversi distretti varia in relazione allo stato della cellula. Di conseguenza, la necessità e la proposta di una nuova terminologia, quale quella di “anticorpi anti antigeni intracellulari”, che possa descrivere con maggiore precisione il reale significato del test, e cioè l'evidenziazione di autoanticorpi diretti contro qualsiasi epitopo e costituente cellulare rilevabile con le attuali procedure diagnostiche. Tuttavia visto l'uso ormai radicato da più di 50 anni e universalmente adottato del termine ANA, si preferisce mantenere l'attuale dicitura eventualmente con la specifica “ANA-anticorpi anti-antigeni cellulari”.

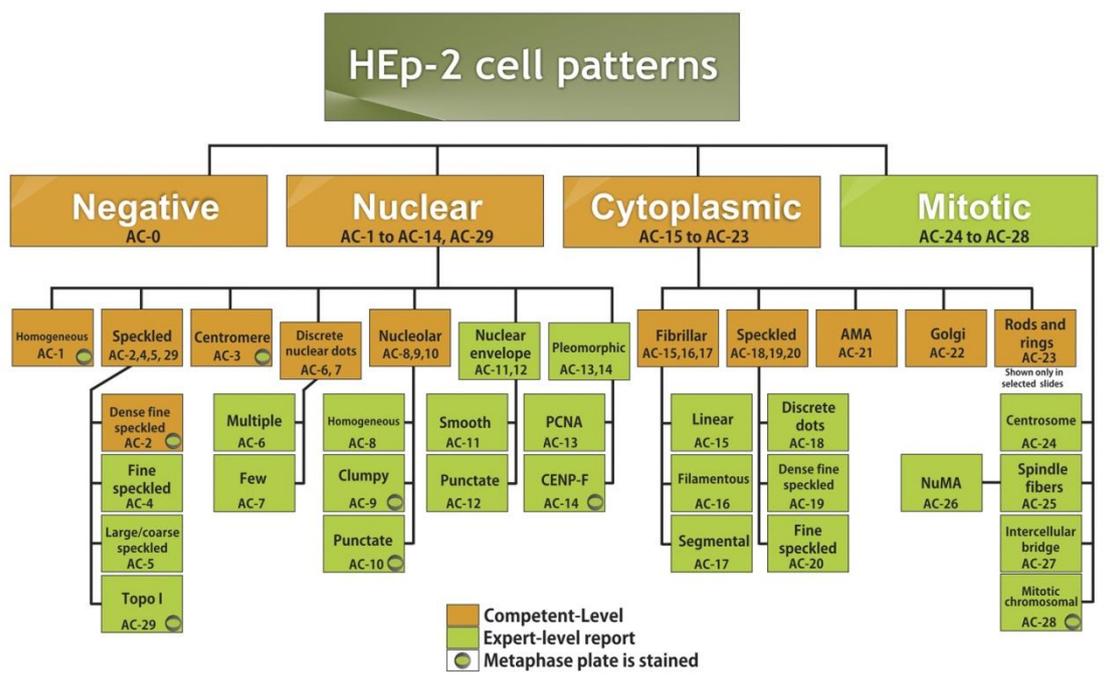
E' stato istituito un comitato di lavoro internazionale di esperti per stabilire un consenso sulla nomenclatura dei quadri fluoroscopici osservati nel test di immunofluorescenza indiretta su HEp2 nominato Consensus Internazionale sui Pattern degli Anticorpi Antinucleo ( ICAP ). Il primo comitato di lavoro si è riunito nell'Agosto del 2014. In seguito si sono tenuti altri tre incontri consecutivi, l'ultimo tenutosi a Kyoto, in Giappone, nel settembre 2016.

Nella classificazione originale dell'ICAP, inizialmente, sono stati riconosciuti 28 distinti quadri fluoroscopici, contrassegnati da un codice alfanumerico AC (quadro anticellulare) e sono stati

riassunti in tre categorie principali, che sono nucleare, citoplasmatico e mitotico, in particolare sono stati definiti 14 quadri fluoroscopici nucleari ( da AC-1 a AC-14), 9 citoplasmatici (da AC-15 a AC-23) e 5 mitotici ( da AC-24 a AC2-8).

E' stato recentemente incluso un nuovo quadro fluoroscopico nella categoria nucleare, riconosciuto come Topoisomerasi I (AC-29).

Inoltre, durante l'incontro di Kyoto è stato definito anche un consenso per inserire il quadro fluoroscopio negativo come AC-0. [1,2] [Fig.1]



**Fig 1. Albero di classificazione e nomenclatura secondo ICAP.**

Nonostante il loro ruolo patogenetico sia ancora oggetto di studio e controversie, la caratterizzazione delle correlazioni tra quadro sierologico e quadro clinico ha consolidato l'assunzione che la positività degli ANA sia associata con alcune malattie reumatiche autoimmuni (ARD), essendo coinvolti principalmente nel lupus eritematoso sistemico (LES), nella sindrome di Sjögren (SSJ), nella sclerosi sistemica (SSc), nella connettivite mista (MCTD), nella connettivite indifferenziata (UCTD), nella dermatomiosite-polimiosite (DMPM), le cosiddette “malattie reumatiche autoimmuni ANA-associate (AARD)”. In particolare è utile nello screening iniziale del LES e nell'inquadramento diagnostico di SSJ, MCTD, LES da farmaci, DM/PM e SSc; costituisce un criterio classificativo-diagnostico per LES, MCTD, SSJ, SSc e ha un ruolo di supporto alla diagnosi per Sindrome anti-tRNA sintetasi, Sindrome da anticorpi anti fosfolipidi (APS), artrite cronica giovanile.

In aggiunta si è osservato come la positività ANA possa precedere di anni le manifestazioni cliniche della patologia autoimmune indicandone anche un possibile utilizzo come valore predittivo, che offre quindi l'opportunità di interventi precoci in termini di prevenzione e di trattamento per modificare la storia naturale della malattia.

Infine in alcune condizioni (LES, DMPM, SSJ) fornisce indicazioni sulla severità del decorso clinico assumendo pertanto anche un valore prognostico [3].

La tecnica tradizionalmente usata per la valutazione degli ANA è l'Immunofluorescenza Indiretta (IIF) su cellule Hep-2, una linea cellulare di carcinoma faringeo che, rispetto ai tessuti precedentemente usati, ha il vantaggio di crescere in colture asincrone consentendo pertanto l'esposizione degli antigeni cellulari tipici di tutte le fasi del ciclo cellulare. Esso è ritenuto il metodo di riferimento nella diagnostica immunologica, ma presenta alcuni elementi sfavorevoli (soggettività, necessità di morfologi esperti, basso livello di standardizzazione) che hanno posto l'interrogativo di una possibile sostituzione con altre tecniche. Sia i metodi immunometrici a singola determinazione, come le tecniche ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) e CLIA (chemiluminescent immunoassay), sia i metodi a multipla determinazione, come l'Immunoblot, sono stati proposti come sostituti della tecnica IIF per la rilevazione degli ANA. Tuttavia non si sono dimostrati in grado di fornire la stessa accuratezza analitica dell'IIF, in particolare per la possibilità di falsi risultati negativi in caso di autoanticorpi rari, riaffermando la superiorità diagnostica del metodo IIF. La continua innovazione tecnologica inoltre, ha portato ad estendere l'automazione della procedura non solo alla fase di preparazione dei substrati, ma anche alla fase di lettura microscopica, con digitalizzazione delle immagini fluoroscopiche e classificazione dei pattern secondo procedure standardizzate. Sebbene tali sistemi automatici presentino una sensibilità prossima al 100% nello screening positivi/negativi, non sembrano ancora perfettamente evoluti per la quantificazione degli ANA e per l'accurato riconoscimento del pattern [4].

Nello screening per le malattie reumatiche autoimmuni l'IIF è dotato di un'elevata sensibilità diagnostica, specialmente per il LES, 95%, il LES da farmaci, 100% e la MCTD, 100%. Tuttavia, un risultato positivo del test non è specifico di ARD: gli ANA sono infatti presenti anche in pazienti non affetti da patologie autoimmuni (malattie infettive, neoplastiche ecc.), in pazienti che assumono diversi farmaci e in soggetti sani (più frequentemente di sesso femminile, anziani e parenti di primo grado di pazienti con malattie autoimmuni). Pertanto in ragione della sua non elevata specificità, il test deve essere richiesto come supporto alla diagnosi di ARD in pazienti con caratteristiche cliniche suggestive di una patologia reumatica. Allo stesso tempo è bene che il laboratorio emetta il risultato fornendo al clinico tutte le peculiarità (metodica usata, eventuale

interpretazione delle positività ottenute) che gli consentano di meglio interpretare un risultato positivo e di evitare misunderstanding dannosi per il paziente e per l'economia sanitaria. [4,5]

La refertazione degli ANA si realizza indicando titolo e pattern fluoroscopico.

La titolazione indica la diluizione massima alla quale è ancora percepibile una fluorescenza al microscopio. Col tempo il cut-off per considerare il test positivo è stato progressivamente aumentato a seguito dell'osservazione che la percentuale di pazienti sani, ovvero con autoimmunità naturale, risultava via via diminuire con diluizioni successive. Pertanto la soglia di 1:40 (20-30% soggetti sani) è stata spostata a 1:80, diluizione che consente di avere una sensibilità del 90,2% e una specificità del 87,1% (10-20% di soggetti sani sarà positivo al test) con un valore predittivo negativo del 98,1%. Per tali ragioni se il test è negativo alla diluizione 1:80 si può considerare tale risultato come vero negativo mentre il test positivo alla diluizione 1:80 viene considerato “basso positivo” e raccomanda un monitoraggio nel tempo. È considerato invece “positivo e clinicamente significativo” alla diluizione 1:160 (sensibilità 83,7% specificità 93%) e prevede un approfondimento diagnostico coi test di secondo livello collegati al pattern individuato, per evidenziare la specificità degli autoanticorpi individuati. A tale diluizione infatti solo il 5% della popolazione sana risulterà falsamente positivo, percentuale che si riduce ulteriormente se la positività permane a diluizioni maggiori (a 1:320 il 3% di soggetti sani).

L'altro parametro che viene valutato e che guida il sospetto del tipo di malattia autoimmune è il quadro fluoroscopico (pattern). Gli autoanticorpi presenti nel siero del paziente che hanno legato gli antigeni espressi dal substrato, vengono evidenziati attraverso anticorpi anti-immunoglobuline umane coniugati con una sostanza fluorescente. Pertanto a seconda della specificità autoanticorpale si otterranno quadri fluoroscopici diversi e direttamente associabili, in alcuni casi, all'antigene bersaglio intracellulare. Come precedentemente accennato, poiché gli Autoanticorpi Antinucleo non sono esclusivamente localizzati nel nucleo cellulare, il test deve considerarsi positivo anche laddove sia presente una reattività del citoplasma o dell'apparato mitotico e si è proposta una nuova modalità di refertazione che comprenda una descrizione distinta della fluorescenza nucleare, mitotica e citoplasmatica [6].

## **Autoanticorpi anti-DFS70: la scoperta**

Negli ultimi anni è stato descritto un nuovo pattern fluoroscopico denominato “dense fine speckled” (DFS) per la caratteristica fluorescenza finemente granulare riguardante sia il nucleo delle cellule in interfase sia la cromatina delle cellule in metafase. Esso fu inizialmente osservato già in un gruppo

di individui affetti da cistite interstiziale (IC) nel 1994. In seguito con l'immunoblot, eseguito con un estratto di coltura tissutale come fonte dell'antigene responsabile di tale pattern, si evidenziò che i sieri dei pazienti studiati, portatori degli autoanticorpi, reagivano con una proteina di 70-75 kD. L'antigene così individuato, fu denominato “dense fine speckled 70 kD” (DFS70) per sottolineare sia la sua immunolocalizzazione sia il suo peso molecolare [reviewed in 7].

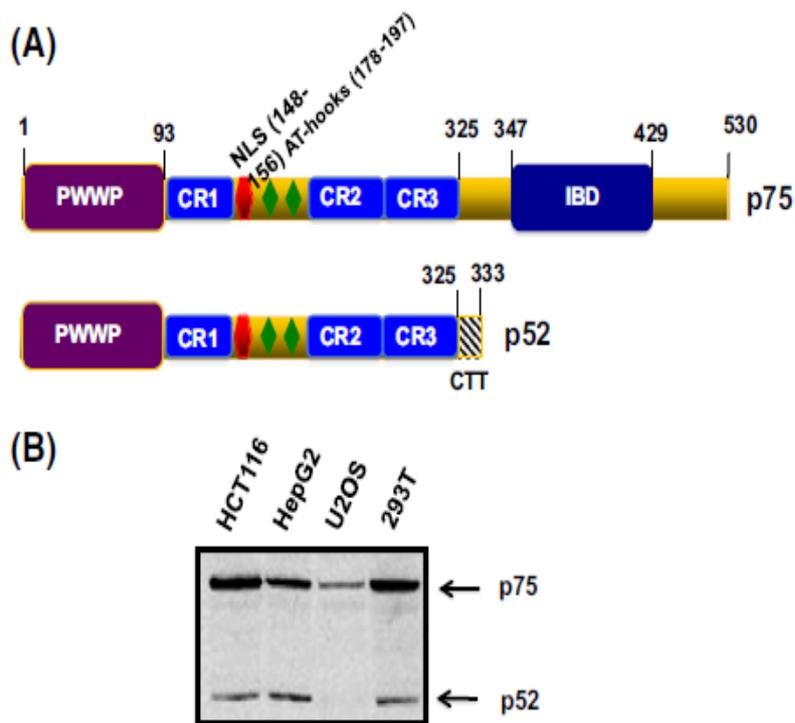
In uno studio successivo, uno dei sieri che presentava un alto titolo di autoanticorpi e che era disponibile in elevata quantità, fu utilizzato per isolare la sequenza complementare di DNA (cDNA) e la sequenza aminoacidica del nuovo antigene individuato, e si scoprì che DFS70 era identico al “transcription coactivator p75 (TCp75)” ed al “lens epithelium derived growth factor (LEDGF)” già depositati nella GenBank [8]. TCp75 e la sua variante di splicing p52 erano stati identificati come regolatori dell'attivazione della trascrizione mediata dal complesso dell' RNA polimerasi II [9], mentre LEDGF era stato descritto come fattore di crescita delle cellule epiteliali del cristallino [10,11]; tuttavia, contrariamente alle prime evidenze, è stato dimostrato che tale proteina è ubiquitariamente espressa nei tessuti dell'organismo e che svolge funzioni di risposta allo stress piuttosto che di fattore di crescita.

### **L'antigene DFS70/LEDGFp75: struttura e funzione**

DFS70/LEDGFp75 e LEDGFp52 sono le due principali varianti di splicing derivate dallo stesso gene PS1P1/LEDGF localizzato nella regione cromosomica 9p22.2.

Esse presentano diversi pattern spaziotemporali di legame alla cromatina, localizzano in differenti regioni nucleari così come la loro espressione è variabile a seconda dei tessuti e quando iperespressi sembrano avere funzioni opposte, di risposta allo stress nel caso di p75 e pro-apoptotica nel caso di p52.

Dal punto di vista strutturale [Fig.2], condividono la porzione N-terminale (residui 1-325) costituita da una serie di elementi che sono coinvolti nel legame alla cromatina tra cui il dominio prolina-triptofano-triptofano-prolina (PWWP) che è altamente conservato tra i membri della famiglia degli Hepatome-derived-growth-factor (HDGF) a cui, per tale ragione, anche LEDGF è stato ascritto [reviewed in 7].



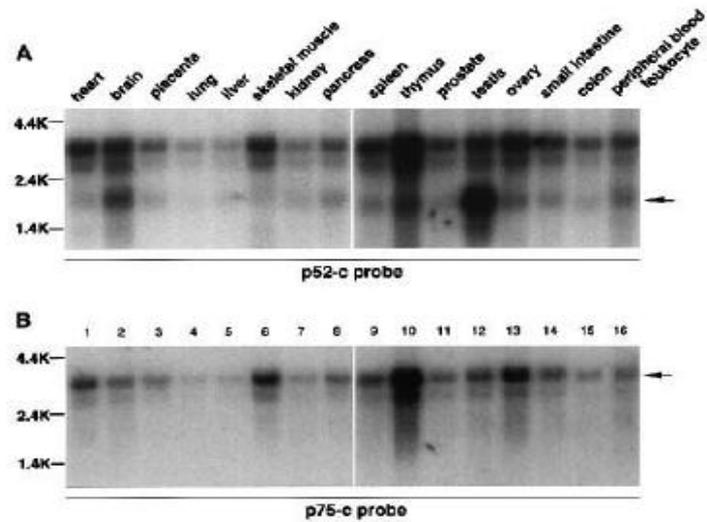
**Fig.2 Principali varianti di splicing di DFS70/LEDGFp75.**

(A) Rappresentazione delle due maggiori varianti di splicing di DFS70/LEDGFp75, chiamate p75 and p52, con i loro domini e motivi. (B) Immunoblot che mostra la reattività di un anticorpo monoclonale (BD Biosciences) diretto contro la regione N-terminale di DFS70/LEDGFp75, che riconosce entrambe le varianti di splicing in un pannello di linee cellulari tumorali. [7]

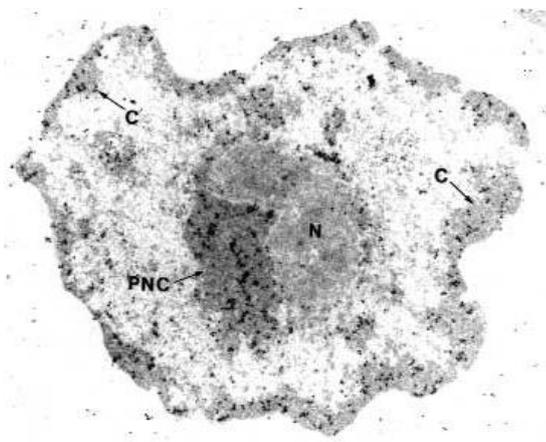
Per quanto riguarda la porzione C-terminale invece, p52 presenta una coda di otto aminoacidi (residui 326-333) mentre p75 (residui 325-530) contiene due domini elica-elica in grado di legare elementi heat shock entro le regioni promotori di geni correlati allo stress (attività trascrizionale, attività di promotore di sopravvivenza allo stress, attività di interazione proteina-proteina); un dominio funzionale e conformazionale altamente conservato, contenente l'epitopo riconosciuto dagli autoanticorpi anti-DFS70 (residui 349-435) [12], spiegando così la ragione per cui tali autoanticorpi reagiscano con p75 e non con p52 [8]. Questo stesso dominio è stato identificato con la regione “integrase binding domain (IBD)” (residui 347-429) che lega l'integrasi del virus HIV-1 (HIV-IN). Tale interazione determina la stabilizzazione di HIV-IN, il suo trasporto nel nucleo e infine l'integrazione del dna virale nel genoma cellulare, preferenzialmente in zone molto trascritte, ricche di introni e ampiamente soggette a splicing. Ciò sarebbe possibile grazie al ruolo di shuttle del LEDGFp75 che solitamente si trova associato a numerosi fattori di splicing, e potrebbe spiegare la tendenza pro-oncogenica delle cellule infettate [13].

E' stato dimostrato come il trascritto di LEDGF sia ubiquitariamente localizzato in tutti i tessuti dell'organismo con una maggiore prevalenza di p75 nel timo [9, 14] [Fig.3].

**Fig. 3.** Analisi Northern blot. (A) Poly(A) RNAs isolati da tessuti umani (ClonTech) sono stati ibridati con una sonda per p52 cDNA (PstI–BglII fragment, bp 624–1160). Le fonti degli RNAs sono indicate in alto, e le dimensioni dei markers RNA sono indicate (in kb) a sinistra. (B) I filtrati da (A) sono stati rivalutati con un frammento PCR corrispondente alla unica regione codificante di p75. [9]



Per quanto riguarda invece il livello ultrastrutturale, studiando le cellule epiteliali del piccolo intestino, si è osservato come sia localizzato nella cromatina in interfase e in particolare nelle aree di cromatina condensata nella periferia del nucleo e in sede peri nucleolare [8]. [Fig.4]



**Fig 4.** La microscopia immunoelettronica ha rivelato che DFS70 era concentrato nella cromatina condensata delle cellule in interfase, specialmente al di sopra delle aree di cromatina condensata (C) e di cromatina perinucleolare (PNC). Invece il nucleolo (N) e le regioni di intercromatina ne contenevano meno. [8]

E' stato ipotizzato che la sua espressione sia correlata al differenziamento cellulare, come suggeriscono alcune osservazioni: il riscontro in maggiore quantità (in forma sia di trascritto che di proteina) nel cervello fetale rispetto al cervello dell'adulto [reviewed in 7], la progressiva perdita dai nuclei delle cellule epiteliali del cristallino differenziate [15], la localizzazione nei nuclei delle cellule dello strato basale dell'epidermide e la sua traslocazione durante il differenziamento nel citoplasma, dove viene prevalentemente riscontrato nello strato di cellule granulari accumulato nei granuli cheratoialini [16].

Inoltre si è osservato un aumento della sua espressione (in forma di trascritto o di proteina), a distribuzione sia nucleare che citoplasmatica, in molti tessuti neoplastici (di prostata, colon, tiroide, mammella, fegato e utero) se confrontati con i corrispettivi tessuti sani [17]. Tale evidenza supporterebbe l'ipotesi che LEDGFp75 possa avere anche un ruolo come oncogene nelle neoplasie umane, infatti, quando iperespresso, determinando un'aumentata attivazione di pathways protettivi allo stress, potrebbe promuovere la proliferazione e la sopravvivenza cellulare, nonché la migrazione cellulare, l'angiogenesi e la resistenza a chemioterapia [reviewed in 18]. Per esempio la traslocazione t(9;11)(p22;p15) riscontrata in individui con Leucemia Mieloide Acuta de novo, risultando nelle proteine di fusione NUP98/LEDGF, provocherebbe una disregolazione dei processi di promozione della crescita e sopravvivenza cellulare con un ruolo patogenetico nello sviluppo della malattia [19]. Un'aumentata espressione di tale trascritto aberrante, è anche stata riscontrata in cellule leucemiche resistenti ai trattamenti chemioterapici [reviewed in 18]. LEDGF, inoltre, è considerato un autoantigene del carcinoma prostatico in quanto gli anticorpi anti DFS70 sono stati riscontrati con una prevalenza del 22% in una coorte di soggetti affetti. La sua espressione risulta aumentata nei tessuti di neoplasia prostatica suggerendo che possa essere coinvolto direttamente nei processi di cancerogenesi [20]. Anche in questo contesto, sembra avere un ruolo attenuante della morte cellulare indotta dai trattamenti chemioterapici [reviewed in 18].

La funzione di LEDGFp75 originariamente era ritenuta essere quella di fattore di crescita per le cellule del cristallino e di coattivatore della trascrizione. In seguito si comprese come esso svolgesse prevalentemente un ruolo di proteina di risposta allo stress. Infatti la presenza di stressors cellulari, quali irradiazione con UVB, perossido di idrogeno, alcohol ipertermia, deprivazione di nutrienti, certi virus e farmaci citotossici, determina un aumento dello stress ossidativo della cellula che induce l'upregulation e l'attivazione di LEDGFp75. LEDGFp75 sembrerebbe esplicare tale funzione promuovendo la trascrizione di geni di risposta allo stress, antiossidanti e proinfiammatori attraverso l'interazione, da parte di entrambe le regioni N e C terminali, con proteine associate alla cromatina o direttamente con i promotori [reviewed in 7].

Inoltre è implicato nei processi di riparazione del DNA conseguente a danni di tipo ossidativo, pertanto esso possiede un'attività antiapoptotica [21].

Nel contesto di tali funzioni è interessante notare come sia stato evidenziato una probabile interazione tra LEDGFp75 ed i pathways infiammatori, in particolare induce la via IL-6/STAT3 nelle cellule cutanee HaCaT e stimola il rilascio di TNF e IL-8 da parte dei cheratinociti [reviewed in 7].

In Tabella 1 sono riassunte le principali funzioni cellulari di DFS70/LEDGFp75.

**Tabella 1:** Principali funzioni cellulari di DFS70/LEDGFp75, modificata. [18]

<b>Funzione</b>	<b>Meccanismo</b>
Segnale di apoptosi	Durante l'apoptosi viene clivato dalle caspasi in frammenti; tale clivaggio abolisce le sue attività di promotore della sopravvivenza cellulare ma non altera la regione dell'autoepitopo
Sopravvivenza allo stress cellulare	Protegge le cellule di mammifero da una varietà di stressors ambientali (come UVB, stress ossidativo, stress termico, alcol, farmaci)
Chemioresistenza	Risulta iperespresso nelle cellule cancerose chemioresistenti; promuove la stabilità lisosomiale nel contesto della morte cellulare indotta da farmaci caspasi-indipendente
Legame alla cromatina	Facilitato da suo dominio PWWP, dai motivi AT-hook e dalle regioni cariche positivamente
Sviluppo	Il suo silenziamento è associato con anomalie scheletriche e craniofacciali, probabilmente dovute al deficit di attivazione dei geni HOX
Riparazione DNA	Componente del complesso di ricombinazione omologa
Integrazione HIV-1	Lega la HIV-integrasi a siti trascrizionalmente attivi per facilitare l'integrazione di HIV-1
Infiammazione	Implicato nell'attivazione della via IL6/STAT3
Leuchemogenesi	Iperespresso nei blasti leucemici chemioresistenti; forma proteine di fusione con NUP98 in alcuni pazienti leucemici
Trasformazione maligna	Iperespresso in cellule neoplastiche e in alcuni tumori solidi; promuove segnali di sopravvivenza cellulare, proliferazione, migrazione, clonogenicità, angiogenesi, e crescita tumorale
Importo nel nucleo	Mediata da singole regioni NLS (nuclear localization signal)
Interazioni proteina-proteina	Si lega ad alcune proteine cromatina-associate (come HIV-IN, MeCP2, MML-menin, JPO2) attraverso i suoi domini PWWP e IBD
Trascrizione	Interagisce con il complesso di trascrizione della RNA polimerasi-II; contribuisce all'attivazione di geni implicati nella risposta allo stress, dell'infiammazione, tumore-associati, HOX; potrebbe anche agire come soppressore a seconda del contesto

## Proprietà generali degli autoanticorpi anti-DFS70 e metodi per la loro determinazione

Gli autoanticorpi anti-DFS70 sono prevalentemente di tipo IgG e riconoscono un autoepitopo (aa 347-429) localizzato nella porzione C-terminale di DFS70/LEDGFp75. Tale regione corrisponde al dominio IBD che interagendo con l'integrasi del virus HIV-1 consente l'integrazione del dna virale con il genoma cellulare [12]. Le sue caratteristiche di essere una regione conformazionale e funzionale altamente conservata nell'evoluzione, corrispondono alle peculiarità che contraddistinguono gli epitopi riconosciuti preferenzialmente dagli autoanticorpi [reviewed in 7].

Ad oggi non è stata stabilita nessuna correlazione con specifici alleli HLA: sembra esservi un'aumentata frequenza degli alleli HLA-DRB1, -DQB1, -DPB1 in pazienti con anticorpi anti-DFS70, ma tali dati non sono risultati statisticamente significativi e la coorte di pazienti considerata non era ristretta a nessuna patologia specifica [22].

Nel contesto dello screening ANA eseguito con la tecnica dell'immunofluorescenza su Hep-2 la presenza di autoanticorpi anti DFS70 determina il “dense fine speckled” pattern. Esso è stato inserito nella più recente classificazione dei pattern ANA [1] secondo la nomenclatura AC-2 ed è tipicamente caratterizzato da una “fluorescenza finemente granulare dei nuclei in interfase con eterogeneità nella dimensione, brillantezza e distribuzione dei granuli associato ad aree dove questi si trovano più densi e aree dove invece sono più rarefatti; la piastra metafasica presenta un pattern granulare con alcuni grossi granuli in risalto”. [Fig.5]



**Fig 5.** Pattern AC-2 “dense fine speckled” su cellule Hep-2. I nuclei in interfase e la cromatina in metafase presentano una fluorescenza finemente granulare. [2]

Tali caratteristiche consentono di distinguerlo sia dal classico pattern nucleare omogeneo, caratterizzato da fluorescenza omogenea e regolare nei nuclei in interfase e intensa fluorescenza, con colorazione ialina omogenea, a livello della cromatina nei nuclei in metafase, sia dal pattern nucleare speckled (fine e coarse speckled) caratterizzato da nucleoplasma granulare (a granuli di piccole o grosse dimensioni) e assenza di segnale nella massa cromatinica delle cellule in mitosi [2].

La frequenza con cui tale pattern viene riscontrato in coorti di pazienti sottoposti a screening ANA, varia dal 0,8% al 16,6% a seconda degli studi, con una frequenza media dello 7,6%. [reviewed in 7] Solitamente occorre come unica specificità ANA presente nel siero ed a titoli nel range medio-elevato (uguale o superiore a 1:320) [8, 23, 24].

Tuttavia diversi studi hanno evidenziato come riconoscere tale pattern sia particolarmente difficoltoso: ad esempio, Bentow et al. [25] coinvolsero 125 laboratoristi in un'indagine internazionale per valutare l'accuratezza dell'identificazione del DFS pattern, e dimostrarono che meno del 50% lo identificò correttamente quando presente come monospecificità mentre meno del 10% quando presente con altri patterns, percentuali significativamente inferiori rispetto alla concordanza con cui venivano identificati gli altri pattern.

Bizzaro et al. [26] invece, notarono che l'86% di sieri con DFS pattern all'IIF non presentavano anticorpi anti-DFS70 se valutati con un' ELISA (enzime-linked immunosorbent assay) specifico per il DFS70. In uno studio successivo ottennero che solo il 30,6% dei sieri con DFS pattern erano positivi per gli anti-DFS70 se valutati con la tecnica CLIA (chemiluminescent immunoassay) [27]. Tali discrepanze vennero attribuite a molteplici ragioni: la possibilità che gli anticorpi che producono il DFS pattern siano molto eterogenei e riconoscano epitopi non espressi dalla conformazione dell'antigene usato nei test specifici; un' intrinseca difficoltà nell'individuare il DFS pattern che, essendo molto discrezionale e soggettivo, determina un' elevata variabilità interosservatore; le possibili differenze tra i substrati cellulari utilizzati all' IIF, (ad esempio dal confronto tra quattro differenti linee di Hep-2, Inova, Bion, Bio-Rad e Euroimmun, solo 3/13 sieri anti-DFS70 positivi all' ELISA, presentavano il DFS pattern in tutte e quattro le linee cellulari [26]). Gli stessi autori valutarono sieri presentanti DFS pattern valutati all'immunofluorescenza su sezioni criostatiche di tessuto oculare di topo, e osservarono una reattività verso diverse strutture oculari e non esclusivamente verso l'epitelio corneale, l'unico che invece risultava positivo al controllo con anticorpi anti-LEDGFp75. Inoltre più del 60% dei sieri analizzati non dava alcuna fluorescenza sul tessuto oculare. Proposero pertanto che gli anticorpi responsabili del DFS pattern sulle cellule Hep-2 potessero riconoscere in realtà autoantigeni diversi da LEDGFp75 o autoantigeni ad esso associati [87]. Tale ipotesi venne valutata per la proteina MeCP2 che interagisce con LEDGF e

localizzata nel nucleo. Inoltre gli anticorpi anti-MeCP2 producono una fluorescenza simile a DFS pattern all' IIF eseguito su Hep-2. Tuttavia tutte le tecniche usate erano concordi nell' escludere una cross-reazione tra sieri anti-MeCP2 e sieri anti-DFS70, confermando che questi ultimi sono altamente specifici per DFS70/LEDGFp75 [29].

L'IIF ha pertanto dimostrato una bassa accuratezza nell'identificare anticorpi anti-DFS70, vista la tendenza a produrre un alto tasso di risultati falsi positivi, con rischio di incorrere in errori diagnostici. Pertanto le attuali evidenze sostengono la necessità di refertare la positività per anti-DFS70 solo dopo aver studiato il DFS pattern dell'IIF con una combinazione di diverse tecniche di laboratorio in grado di confermare la presenza di tali anticorpi.

Tra queste le principali validate e ad oggi disponibili sono:

- ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay): la titolazione degli anticorpi anti-DFS70 viene determinata sulla base dell'entità della reazione enzimatica che si realizza dall'interazione tra il substrato, aggiunto al preparato, e l'enzima legato agli anticorpi anti-IgG umane. La reazione è proporzionale alla quantità di autoanticorpi del siero che hanno legato l'antigene LEDGF e che vengono riconosciuti dagli anticorpi coniugati [26].
- CLIA (chemiluminescent immunoassay): la titolazione degli anticorpi anti-DFS70 viene determinata sulla base della luminescenza prodotta da un coniugato legato agli anticorpi anti-IgG umane, che risulta pertanto proporzionale alla quantità di anticorpi che hanno interagito con gli autoanticorpi legati all'antigene purificato LEDGF [27].
- Dot/line-Immunoassay o Immunoblot: il siero viene incubato su un foglio di nitrocellulosa in cui è stato trasferito mediante elettroforesi un lisato cellulare. La reazione degli autoanticorpi con il DFS70 (proteina di 70 kD) può essere individuata mediante immunoenzimatica o chemiluminescenza [30].
- Immunoabsorption test: al siero viene aggiunto un buffer contenente l'antigene ricombinante DFS70 che previene il legame degli anticorpi anti-DFS70 presenti nel siero con l'antigene espresso dalle cellule Hep-2 usate come substrato [27].

## **Correlazioni cliniche degli autoanticorpi anti-DFS70**

Fin dalla loro scoperta, molti studi sono stati condotti con lo scopo di identificare il significato clinico degli autoanticorpi anti-DFS70, tuttavia la questione è tuttora poco chiara. Inizialmente furono individuati con varia prevalenza in alcune patologie quali dermatite atopica (30%), asma (16%), psoriasi (4,5%), sindrome della fatica cronica (3,3%), a fronte di una bassa prevalenza osservata in pazienti con malattie reumatiche autoimmuni (ARD) [8, 31, 32].

Successivamente essi furono identificati in alcune patologie oculari come malattia di Vogt-Koyanagi-Harada (VKH) (66%) [33], degenerazione retinica atipica (100%) [34], cataratta età-correlata [reviewed in 18], cataratta associata alla dermatite atopica [33], e fu dimostrata un'attività citotossica di tali autoanticorpi nelle colture di cellule epiteliali di cristallino [36].

Furono trovati nel 19,8% di pazienti con alopecia areata [37] e furono descritti come autoanticorpi tumore-associati (AAB) in pazienti con carcinoma prostatico (22%) [18]. Un altro studio ha tuttavia identificato solo l'1,8% di pazienti con vari tumori (mammella, prostata, colon-retto, polmone, leucemia, linfoma) portatori degli anti-DFS70 [28].

Un'ulteriore associazione è stata descritta con la tiroidite autoimmune, il cui sembrano avere una prevalenza del 16% [38].

Oltre alle correlazioni con diverse patologie, è stata anche descritta un'alta prevalenza di anticorpi anti-DFS70 in “individui apparentemente sani (HI)”, reclutati prevalentemente tra donatori di sangue e personale ospedaliero [39, 40]. Tale dato però non è stato univocamente confermato e la loro frequenza varia dal 0% al 22% a seconda degli studi [reviewed in 41]. In questa categoria di soggetti sembra esservi una correlazione positiva con la giovane età (under 35), mentre nessuna correlazione di genere è stata confermata [39, 24]. Per quanto riguarda possibili associazioni etniche, in realtà non sono state riscontrate differenze significative: la prevalenza tra i giapponesi è risultata del 10,7% [39], 8,5% negli Americani, 1,7% in Italia e Spagna, 2,9% in Germania [40], Danimarca 2% (donatori di sangue) [42], Ispanici Messicani 17,4% [43].

Sembra comunque che tali autoanticorpi siano relativamente comuni in individui ANA positivi senza evidenze di ARD [38] e che invece si riscontrino con una bassa frequenza nelle ARD [44, 45]. Una metanalisi di tutti gli studi pubblicati a riguardo ha registrato che la frequenza media in pazienti con ARD risulta essere del 2,9% e nello specifico: del 2,7% nel LES, dell' 1,5% nella SSc, del 9,7% nella SSJ, del 3,5% nelle IIM, dello 0,8% nell' AR e del 10,8% nella UCTD [reviewed in 41].

Muro et al. in particolare hanno esaminato una coorte di 500 pazienti con ARD e hanno osservato come solo 22 (4,4%) presentassero una positività per gli anticorpi anti-DFS70 e di questi solo 3 in come unica specificità ANA individuata (monospecificità), quindi l'86% dei pazienti con ARD che producono anti-DFS70 hanno almeno un altro autoanticorpo marcatore di ARD e raramente presentano all'IIF il DFS pattern. In nessuno dei tre pazienti con monospecificità, inoltre, la positività ANA risultava indispensabile per soddisfare il numero di criteri necessario per porre la diagnosi [46]. La prevalenza di anti-DFS70 nelle ARD pertanto risulta ancora inferiore se si considerano solo i pazienti dove questi sono presenti in monospecificità: 0,5% nelle ARD complessivamente, 0,7% nel LES, 1% nella SSJ, 0,9% nelle IIM e 8,1% nelle UCTD [41].

Inoltre diversi studi che hanno rivalutato i soggetti apparentemente sani e portatori di anti-DFS70 dopo un lasso di tempo, hanno osservato che nessuno aveva sviluppato ARD nel corso del follow up, a conferma della possibile associazione negativa con le ARD [24, 47].

Queste scoperte, hanno avuto importanti conseguenze sull'affidabilità del test ANA, in quanto la positività per gli anti-DFS70, soprattutto se in monospecificità, sembra avere un ruolo di esclusione delle ARD, piuttosto che di supporto alla diagnosi, come avviene per tutti gli altri anticorpi anti antigeni intracellulari (ANA). Ciò assume una rilevanza particolare nel caso del LES, in quanto la positività ANA è parte dei criteri classificativi sviluppati dall'American College of Rheumatology (ACR) e della Systemic Lupus International Collaborating Clinics (SLICC). Se gli anti-DFS70 non fossero associati alle ARD, potrebbero ridurre la specificità del criterio, vista inoltre la facilità con cui il DFS pattern viene confuso con altri ANA pattern all' IIF. Pertanto è stata proposta una sua riformulazione che escluda la positività monospecifica al DFS70 dai risultati del test ANA diagnostici [7].

Sempre allo scopo di ottimizzare l'utilizzo del riscontro di anticorpi anti-DFS70 come marker per discriminare i pazienti ARD e non-ARD, uno studio recente ha proposto un nuovo algoritmo che include la ricerca degli anti-DFS70 nei pazienti con ANA positivi ma ENA screening e dsDNA negativi. Gli individui con test positivo potrebbero essere esclusi dal follow up, a cui questa categoria di pazienti usualmente va incontro, con conseguente risparmio nella spesa sanitaria: si ridurrebbe infatti il numero di esami e visite mediche eseguite e considerate inutili, in questa categoria, vista la bassa probabilità con cui tale risultato si associa ad ARD. La valutazione di economia sanitaria eseguita dal gruppo di ricerca ha dimostrato come l'applicazione di questo algoritmo sia cost-effective [47].

Con la medesima finalità, è stata messa a punto di un nuovo metodo di immunoassorbimento per gli anticorpi anti-DFS70, che elimina la possibilità di visualizzare all' IIF su Hep-2 il quadro fluoroscopico da essi determinato garantendo una riduzione dei falsi positivi, che da sempre rappresenta uno dei maggiori limiti di tale test [48, 49].

Tra le ARD, gli anti-DFS70 sono stati riscontrati con una frequenza più elevata nei pazienti con UCTD [27, 46]. Nell' ambito di questa condizione clinica bisogna tuttavia differenziare due situazioni, la “UCTD stabile” dalla “UCTD incompleta o atipica”. La prima potrebbe essere un'entità clinica definita e stabile nel tempo, individuata con criteri classificativi preliminari includono almeno una manifestazione clinica di ARD, ANA positivi e una durata di malattia di almeno tre anni; la seconda, invece, rappresenterebbe la fase precoce di un' ARD. In questo scenario gli anti-DFS70 potrebbero risultare utili per differenziare le due varianti di UCTD in quanto, vista la

loro infrequenza nelle ARD e vista l' alta prevalenza nei soggetti sani, consentirebbero di escludere la diagnosi di ARD e quindi di “UCTD incompleta o atipica” in pazienti con UCTD [50].

Recentemente è stata anche ipotizzata una correlazione tra anticorpi anti-DFS70 e trombofilia. Marlet et al. osservarono una prevalenza inaspettatamente elevata (13,1%) di individui con storia di trombosi (arteriose e/o venose) o di complicanze ostetriche in una coorte di pazienti con DFS pattern (55/421) . Di questi, 20/34 pazienti studiati per la presenza di fattori trombofilici risultarono negativi ai test. Invece, in una coorte di 63 pazienti con storia di trombosi (trombosi arteriose idiopatiche come infarto miocardico o infarto ischemico; trombosi venose come trombosi venose profonda o tromboembolia polmonare; complicanze ostetriche, includendo pazienti con  $\geq 3$  aborti prima della 10° settimana di gestazione, morte di feto morfologicamente normale dopo la 10° settimana gestazionale o nascita prematura con eclampsia prima della 34° settimana gestazionale) registrò la presenza di positività al DFS pattern con una prevalenza dell'11,1% (7/63). Di questi 5/7 non presentavano nessun fattore trombofilico (rappresentanti inoltre 13% (5/38) dei pazienti risultati negativi allo screening per trombofilia). Tali dati assumono ancora più rilievo a fronte del fatto che la prevalenza del DFS pattern in una coorte di 300 donatori di sangue, negativi in anamnesi per una storia di eventi trombotici od ostetrici, è risultata essere solo del 3%. Inoltre, nei pazienti con DFS pattern e trombosi l'APTT ratio era significativamente più basso rispetto a quello dei soggetti sani con DFS pattern, ad indicare la presenza di uno stato di ipercoagulabilità, probabilmente dovuto agli anticorpi anti-DFS70, secondo gli autori [51].

Tale studio, per quanto inedito nel contesto di ricerche eseguite finora sull'argomento DFS70, presenta numerose criticità, in primis l'utilizzo di un solo metodo (l' IIF) per individuare la presenza degli anti-DFS70, pertanto i risultati ottenuti sono da interpretare con cautela fintanto che non verranno confermati o smentiti da studi futuri [52].

La prevalenza di anticorpi anti-DFS70 è stata valutata anche nell'ambito di popolazioni pediatriche. Essi sono stati riscontrati in bambini sani con una frequenza simile al limite inferiore del range individuato nelle coorti di adulti sani [53].

In una coorte di 32 pazienti ANA positivi, 4 presentavano anticorpi anti-DFS70 (1,5%). 3 di questi vennero rivalutati dopo tre anni di follow up: nessuno avevano sviluppato ARD, due erano persistentemente positivi di cui uno che era entrato nel periodo della pubertà, mentre il terzo, ancora prepubere, divenne negativo per il DFS70 pur mantenendo la positività degli ANA [54].

Il case report di una paziente di otto anni con glomerulonefrite post streptococcica ha dimostrato come la presenza isolata degli anti-DFS70 abbia contribuito a escludere la possibilità di ARD nella

diagnosi differenziale [55].

Tuttavia un altro studio si rimarca un' elevata frequenza con cui questo marcatore è stato riscontrato in bambini con sclerodermia localizzata (13,8%), dermatomiosite giovanile (18,2%) e uveite (11%) [53].

Kuwabara et al. hanno descritto invece una prevalenza del 40% di anticorpi anti-DFS70 in una coorte di individui affetti da Autoimmune Fatigue Syndrome (AIFS), in particolare hanno rilevato una particolare concordanza tra alto titolo di anti-DFS70 e pazienti con una malattia più severa soddisfacente i criteri per la Chronic Fatigue Syndrome (CFS) [56].

## **Ruolo degli autoanticorpi anti-DFS70**

Nonostante le numerose conoscenze ottenute negli anni relative alla clinica e alla biologia di tale sistema antigene-anticorpo, la comprensione del suo reale significato è ancora elusiva.

Ayaki et al. che dimostrarono che gli anticorpi anti-DFS70/LEDGFp75 erano citotossici per colture di cellule epiteliali del cristallino [36]. Tali cellule infatti sembravano secernere LEDGF nello spazio extracellulare dove, dopo essersi legato alla plasma membrana veniva internalizzato e trasportato nel nucleo per svolgere la funzione di promotore della crescita cellulare. Gli anticorpi pertanto non rendendo la molecola disponibile alle cellule sarebbero responsabili della citotossicità. In vivo tale meccanismo non potrebbe esplicarsi per la presenza della barriera umor acqueo-sangue che impedisce l'ingresso di proteine e grandi molecole nella camera anteriore dell'occhio rendendola una sede immunologicamente privilegiata. Tuttavia l'anzianità e alcune patologie come la dermatite atopica o l'uveite potrebbero determinare un aumento della permeabilità della membrana tale da consentire il passaggio degli autoanticorpi e il loro effetto patogenetico nell'indurre ad esempio la cataratta [36].

Un ruolo simile potrebbe essere svolto anche a livello cutaneo nella dermatite atopica (DA) [35], infatti è stato dimostrato che, in colture di fibroblasti e cheratinociti, la presenza di anti-DFS70/LEDGFp75 determina blocco della crescita e morte cellulare, neutralizzando l'effetto stimolante di LEDGF [11]. Inoltre, la sottoclasse IgG1-anti-DFS70 è stata descritta come la più frequente in pazienti con DA [8], e la contemporanea presenza di IgE-anti-DFS70 e IgG4-anti-DFS70 sembra essere correlata a una maggiore severità della patologia [57]. Poichè nell'epidermide LEDGFp75 è localizzato sia nel nucleo delle cellule basali che nei granuli cheratoialini citoplasmatici dello strato granulare, si è ipotizzato che gli autoanticorpi diretti contro tale antigene possano interferire con le sue funzioni alterando l'omeostasi cutanea [16].

Nei pazienti con alopecia areata lo studio immunoistochimico ha evidenziato la presenza di

LEDGFp75 a livello delle cellule della guaina esterna della radice (ORS) che sembra coincidere con l'area prevalentemente coinvolta nella risposta immune, suggerendo anche in questo caso un possibile ruolo patogenetico degli anticorpi anti-DFS70 [37].

Anche nella sindrome della fatica cronica (CFS), possono essere fatte delle ipotesi circa il ruolo giocato da tali anticorpi, quando riscontrati. Infatti, trattandosi LEDGFp75 di un fattore protettivo nei confronti dello stress cellulare ed essendo stato dimostrato anche un suo meccanismo d'azione autocrino, si può supporre che la presenza di anticorpi diretti contro tale molecola possa alterare la sua funzione protettiva. In effetti la maggiore sensibilità dei pazienti affetti da CFS a qualsiasi tipo di stress sembra concordare con l'ipotesi di una disfunzione dei meccanismi anti-stress [56].

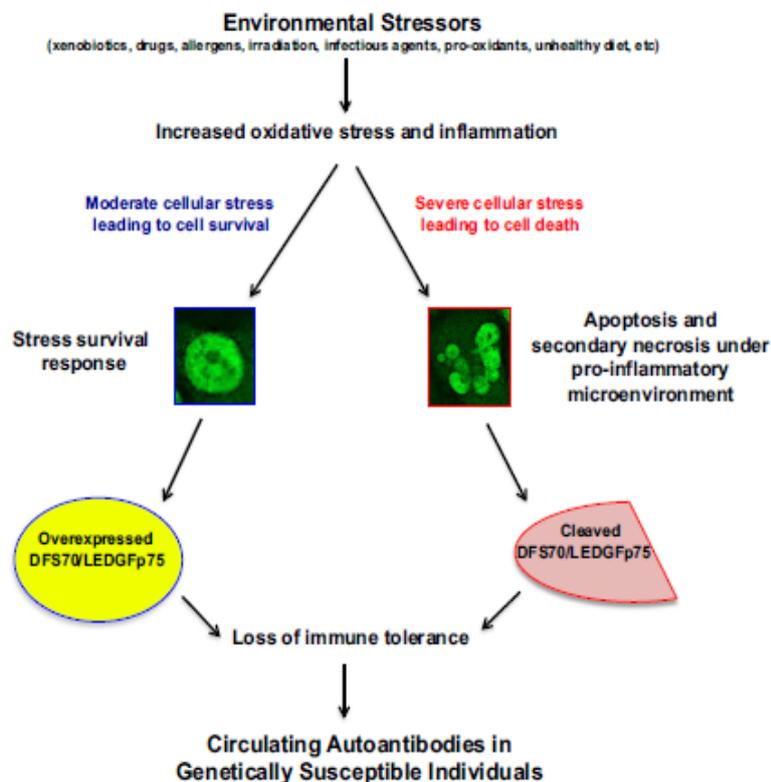
Oltre a un possibile ruolo patogenetico, è stato ipotizzato che gli anticorpi anti-DFS70, in alcune condizioni, possano avere anche un effetto protettivo. Numerosi studi hanno infatti dimostrato una bassa frequenza nelle ARD contrariamente a quanto è stato osservato in individui apparentemente sani (in cui in media sono positivi nel 5-10%). Uno studio condotto su pazienti con dermatomiosite (DM) ha evidenziato una tendenza degli anticorpi anti-DFS70 a aumentare con la guarigione, al contrario degli autoanticorpi specifici di malattia, nel caso specifico gli anti-MDA5ab, che si negativizzano [45]. Anche in pazienti affetti da LES sembra che la positività degli anti-DFS70 sia associata a una minore attività di malattia [44, 58].

Tuttavia le evidenze riguardanti il clivaggio di LEDGFp75 da parte della caspasi-3 durante l'apoptosi, hanno fatto anche supporre che la produzione di anticorpi anti-DFS70 sia un epifenomeno di uno stato di infiammazione e danno cellulare. Infatti, i frammenti così prodotti svolgono un'attività opposta a quella del peptide integro, di induttori della morte cellulare invece che promotori di sopravvivenza, ma, nonostante il clivaggio, presentano inalterata la regione dell'autoepitopo/IBD, risultando anch'essi capaci di elicitare la risposta immunitaria [reviewed in 7]. Tale processo è stato dimostrato in tessuti di neoplasia prostatica dove sembra essere l'unico meccanismo che possa potenzialmente guidare alla produzione degli anticorpi anti-DFS70/LEDGFp75, riscontrati in un 20% di pazienti affetti. L'aumentata espressione di LEDGFp75 in corso di neoplasia, associata al clivaggio caspasi-mediato delle cellule tumorali apoptotiche, genera forme di proteina immunogeniche che in condizioni infiammatorie possono elicitare la risposta anticorpale in alcuni pazienti geneticamente predisposti. Inoltre è stato osservato che queste stesse caratteristiche (infiammazione, stress ossidativo e aumentata espressione di LEDGFp75, morte cellulare aberrante) sono anche implicate in numerose altre condizioni in cui è stata descritta la presenza di anti-DFS70 [20].

In definitiva si può affermare che l'iperespressione di LEDGFp75 associato al clivaggio

proteolitico, in corso di apoptosi, e ad un contesto infiammatorio o comunque di aumentato stress ossidativo, determinerebbero un'espressione anomala di tale autoantigene, un'alterazione della sua immunogenicità ed infine l'elicitazione della risposta anticorpale in soggetti predisposti.

La funzione dinamica di DFS70/LEDGFp75 e la promiscuità del suo dominio rappresentante l'autoepitopo/IBD nell'interagire con multiple proteine, sia self che non, potrebbe concorrere nell'influenzare la sua processazione proteolitica e favorire la presentazione al sistema immune [reviewed in 18]. [Fig.6]



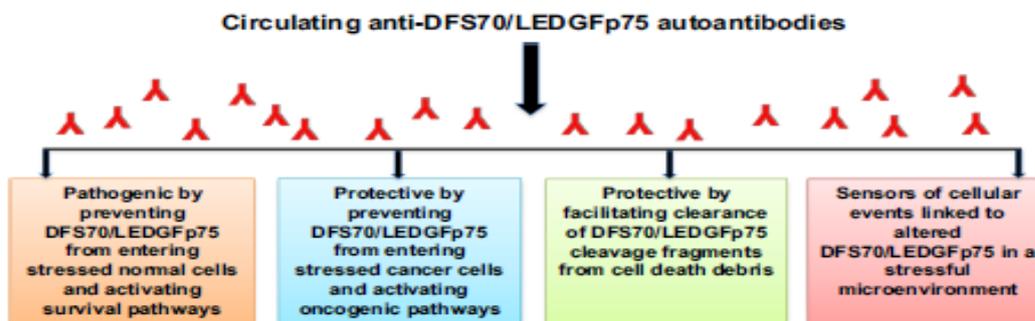
**Fig. 6** Modello per l'elicitazione e il ruolo degli anticorpi anti-DFS70/LEDGFp75. Gli stressors ambientali potrebbero indurre stress ossidativo e infiammazione in certi tessuti, portando ad una risposta allo stress response caratterizzata dall'upregolazione e dall'attivazione di DFS70/LEDGFp75. L'overespressione di DFS70/LEDGFp75 durante una moderata risposta allo stress cellulare o il suo clivaggio apoptotico in corso di danno tissutale e infiammazione indotto da stress severi, potrebbe alterare la sua immunogenicità, determinando l'elicitation di autoanticorpi in individui geneticamente suscettibili. [7]

Le diverse funzioni ascrivibili a tali autoanticorpi sembrerebbero dipendere dal contesto in cui vengono prodotti.

La funzione protettiva potrebbe spiegarsi attraverso la capacità di tali anticorpi di rimuovere i frammenti clivati durante l'apoptosi impedendo loro di indurre morte cellulare e amplificare lo stato infiammatorio.

La funzione patogenetica dipenderebbe dall'interazione con LEDGFp75 extracellulare, di cui potrebbero bloccare l'ingresso nelle cellule e conseguentemente la capacità di attivare pathways che promuovono la sopravvivenza e la crescita cellulare. Tuttavia tale attività di clearance degli LEDGFp75 circolanti potrebbe avere effetti positivi ad esempio in corso di tumori o nell'infezione da HIV, laddove tale antigene avrebbe un effetto protumorale o di promotore dell'integrazione virale.

Infine tali anticorpi potrebbero ritenersi anche dei “sensori” di infiammazione e di danno cellulare, in quanto prodotti in seguito a un difetto dell’eliminazione dei detriti cellulari. Tale caratteristica inoltre sembra accomunare molte delle condizioni infiammatorie nel cui contesto sono stati descritti [reviewed in 7, 18]. [Fig.7]



**Fig. 7** Ruoli potenziali degli autoanticorpi anti-DFS70/LEDGFp75. A seconda del contesto in cui vengono prodotti, questi autoanticorpi potrebbero giocare un ruolo patogenetico, protettivo, o di sensore [7].

#### SCOPO DEL LAVORO:

Alla luce delle nuove acquisizioni, delle questioni ancora aperte e delle importanti ripercussioni che una maggiore chiarezza sul significato clinico della positività autoanticorpale del DFS70 potrebbe avere, era stato condotto un piccolo studio pilota solo genovese presso il Laboratorio di Autoimmunità, per caratterizzare il fenotipo clinico-laboratoristico dei pazienti portatori di autoanticorpi anti-DFS70 individuati nella coorte di soggetti sottoposti ad ANA test, afferenti al laboratorio. In questo studio 6 su 51 pazienti con positività DFS70 avevano avuto riscontro di eventi trombotici rilevanti.

Lo studio genovese è stato d’input per avviare uno studio multicentrico con il gruppo di studio di Autoimmunologia della SIPMeL per verificare, in un’ampia casistica, l’associazione tra anti-DFS70 ed eventi trombotici. Nello specifico dello scopo del presente lavoro, si è voluta indagare in maniera rigorosa l’ipotizzata relazione tra positività per autoanticorpi anti-DFS70 e trombofilia. Ricordiamo che i dati numericamente più consistenti a sostegno dell’esistenza di tale relazione derivano da uno studio su una casistica numericamente abbastanza consistente, ma monocentrica e comunque basata sui soli risultati della valutazione del pattern fluoroscopico, senza indagini con metodiche di conferma della positività anti-DFS 70. I criteri metodologici su cui si è basato il presente protocollo sono stati volti a superare tali limiti. Lo studio e i dati raccolti consentirà di verificare eventuali concordanze/discordanze con quanto è stato descritto finora in letteratura e successivamente di formulare ipotesi per stimolare studi futuri, adeguatamente disegnati, che possano confermare/smentire tali osservazioni.

## **Casistica e Metodi**

Lo studio ad oggi è stato condotto su 633 sieri raccolti dai 12 centri italiani che hanno partecipato alla multicentrica. I 12 centri di raccolta sieri sono elencati qui di seguito: Verona, Bergamo, Bari, Napoli, Palermo, Pescara, Pordenone, Salerno, Siena, Taranto, Tolmezzo e Genova. Tra questi, i centri di Genova e Verona sono stati identificati come i centri di esecuzione dei dosaggi autoanticorpali e, il centro di Tolmezzo, per la raccolta dati e elaborazione.

A Genova presso il Laboratorio di Autoimmunità del DIMI/Policlinico San Martino sono stati convogliati i campioni di tutti i centri di raccolta ed eseguito il dosaggio ANA in IIF.

Successivamente tutti i sieri dosati in IIF sono stati inviati al secondo laboratorio di dosaggio (Verona) per il dosaggio degli anticorpi anti DFS70 sugli stessi sieri con un metodo in chemiluminescenza per (CLIA).

I due laboratori di dosaggio hanno lavorato in doppio cieco.

Entrambi i laboratori di dosaggio hanno inviato i risultati al laboratorio di raccolta dati.

I sieri risultati positivi per DFS70 in IIF e/o in CLIA sono stati nuovamente dosati a Genova con un test di terzo livello con metodo immunoblot.

Sono stati studiati nella totalità 633 sieri, di cui 413 campioni selezionati su base clinica per pazienti con eventi trombotici. Il gruppo di controllo, costituito da 220 sieri è stato selezionato tenendo conto anche dell'età anagrafica, in corrispondenza all'età anagrafica dei sieri del campione di studio.

In particolare sono stati inclusi in base al dato clinico 413 pazienti con eventi trombotici: 116 di questi affetti da sindrome da anticorpi antifosfolipidi (APS), secondo i criteri di Sydney; 77 sieri pz con complicanze ostetriche (ABO); 130 sieri pz con trombosi venosa profonda e 68 pz con trombosi arteriosa (entrambi i gruppi includono pazienti in terapia TAO e NAO); 22 sieri di pz con trombosi arteriosa o venosa in terapia eparinica.

E' stato un criterio di esclusione l'evento trombotico post traumatico o post chirurgico e sono stati esclusi anche tutti i pazienti con cancro.

Nel gruppo di controllo sono stati studiati 120 pazienti: 99 in terapia TAO/NAO per fibrillazione atriale; 28 sieri di pz in terapia eparinica senza trombosi; e 100 sieri di donatori. (Tab.2)

## **Immunofluorescenza Indiretta (IIF)**

L'IIF è stata eseguita usando cellule HEp-2, combinate con il fegato di primate, e anticorpi secondari anti-immunoglobuline umane di tipo IgG forniti da EUROIMMUN. Secondo le istruzioni del Kit, i campioni da testare sono stati diluiti 1:80 in PBS-Tween (10 µl di un campione in 790 µl di PBS-Tween). Nella seduta di dosaggio, tra i campioni sono stati sempre inclusi controlli positivi e negativi, selezionati dai sieri del laboratorio eletti a controllo interno, per la verifica che la seduta sia stata eseguita correttamente. 25 µl di ogni siero diluito sono stati depositati su ciascun pozzetto del supporto vetroso che è stato successivamente coperto con un vetrino, contenente 5x2 Biochip coattati con cellule HEp-2 e fegato di primate, affinché ciascun campione fosse a contatto con il substrato. Dopo un'incubazione di 30 minuti a temperatura ambiente (18°C-25°C), durante la quale avviene il legame tra gli autoanticorpi presenti nel siero e gli antigeni del substrato, i vetrini sono stati lavati immergendoli per almeno 5 minuti in un'apposita cuvette contenente PBS-Tween. Intanto sono stati aggiunti 25 µl di anticorpi anti-IgG umane coniugati con fluoresceina ad ogni pozzetto di un supporto vetroso pulito. I vetrini una volta estratti dal tampone e asciugati nella parte posteriore, sono stati posizionati negli appositi spazi del supporto vetroso verificando l'avvenuto contatto tra Biochip e coniugato, affinché potesse realizzarsi l'interazione tra anti-IgG e le immunoglobuline che erano legate al substrato. Dopo un'ulteriore incubazione di 30 minuti, in cui si è accuratamente evitata l'esposizione alla luce diretta in quanto il coniugato è sensibile alla luce, e dopo il consueto lavaggio, ciascun vetrino è stato montato sui vetrini copri oggetto dove in corrispondenza di ogni Biochip è stata depositata una goccia (max. 10 µl) di liquido di montaggio [59].

Per la maggior parte dei campioni, tali passaggi sono stati eseguiti in modo automatizzato con il sistema IF Sprinter fornito da EUROIMMUN.

La lettura e l'interpretazione dei quadri fluoroscopici è stata eseguita da un operatore esperto sul microscopio a fluorescenza a LED EUROStar III Plus con l'obiettivo x40.

La refertazione è stata effettuata secondo le nuove indicazioni che considerano il test positivo anche laddove sia presente una reattività esclusiva del citoplasma o dell'apparato mitotico, e descrivendo distintamente la fluorescenza nucleare, mitotica e citoplasmatica. La lettura dei diversi ANA patterns è stata eseguita in accordo con le descrizioni proposte dall' International Consensus on Antinuclear Antibody Pattern (ICAP) [2]. In particolare sono stati riconosciuti i seguenti quadri fluoroscopici, secondo le seguenti descrizioni:

- Nucleare Omogeneo (AC-1) o Omogeneo: “Fluorescenza omogenea e regolare nel nucleoplasma. Le cellule mitotiche hanno un'intensa fluorescenza a livello della cromatina, con colorazione ialina omogenea.”

- Nucleare Dense Fine Speckled (AC-2) o DFS: “Pattern punteggiato distribuito nel nucleo delle cellule in interfase con eterogeneità nella dimensione, fluorescenza e distribuzione dei granuli. Caratteristica la presenza di aree con granuli più addensati o rarefatti. La piastra metafasica presenta un intenso pattern punteggiato con alcuni grossi granuli che risaltano.”
- Nucleare Centromerico (AC-3) o Centromerico: “Punti grossi in numero discreto (40-80/cellula) diffusi nelle cellule in interfase, e allineati a livello della cromatina nelle cellule mitotiche.”
- Nucleare Speckled, fine speckled (AC-4)/large speckled (AC-5) o Speckled: “Punti fini e piccoli/grossi granuli diffusi nel nucleoplasma. Le cellule mitotiche non mostrano fluorescenza a livello della massa cromatinica.”
- Nucleolare Omogeneo (AC-8) o Nucleolare: “Fluorescenza diffusa dell' intero nucleolo e assenza di colorazione della piastra metafasica nelle cellule in mitosi.”
- Citoplasmatico Speckled, dense fine speckled (AC-19)/fine speckled (AC-20) o Citoplasmatico: “Piccoli punti distribuiti nel citoplasma, spesso associato ad un fondo omogeneo o finemente punteggiato.”
- Mitotico Midbody (AC-27) o Midbody: “Fluorescenza del ponte intercellulare che connette cellule figlie alla fine della divisione citoplasmatica, ma prima della separazione.”

## **Chemiluminescenza (CLIA)**

La titolazione degli anticorpi anti-DFS70 viene determinata sulla base della luminescenza prodotta da un coniugato legato agli anticorpi anti-IgG umane, che risulta pertanto proporzionale alla quantità di anticorpi che hanno interagito con gli autoanticorpi. La titolazione è stata eseguita sullo strumento bio-flash fornito dalla Inova. Usufruento del QUANTA Flash DFS70, si tratta di un test immunologico in chemiluminescenza per la determinazione semiquantitativa degli anticorpi anti-DFS70 nel siero umano.

Il DFS70 ricombinante è rivestito su sfere paramagnetiche, conservate nella cartuccia di reagente in condizioni tali da conservare l'antigene nel suo stato reattivo. Quando la cartuccia per il test è pronta per essere utilizzata per la prima volta, viene aggiunta una soluzione tampone alla provetta contenente le sfere conservate e le sfere vengono miscelate con il tampone. La cartuccia di reagente viene quindi caricata sullo strumento bio-flash.

Un campione di siero del paziente viene prediluito dallo strumento utilizzando il tampone campione aggiunto a una cuvetta in plastica monouso. Piccole quantità di siero del paziente diluito, le sfere di DFS70 e il tampone del test vengono tutti combinati in una seconda cuvetta e miscelati.

Questa cuvetta viene incubata a 37°C. Le sfere vengono quindi magnetizzate e lavate più volte. Il coniugato anticorpo-isoluminolo viene aggiunto alla cuvetta e incubato a 37°C. Ancora una volta le sfere vengono magnetizzate e lavate ripetutamente. Il coniugato con isoluminolo produce una reazione luminescente quando alla cuvetta vengono aggiunti reagenti (“trigger”). La luce prodotta da questa reazione viene misurata in RLU (unità di luce relativa) dal sistema otticobio-flash. Le RLU sono proporzionali alla quantità di coniugato di isoluminolo legato che a sua volta è proporzionale alla quantità di anticorpi anti-DFS70 legati all’antigene DFS70 sulle sfere.

Il test QUANTA Flash DFS70 utilizza una curva master predefinita specifica per il lotto che viene caricata sullo strumento utilizzando il codice a barre della cartuccia di reagente. In base ai risultati ottenuti utilizzando calibratori, viene creata una Curva di lavoro specifica dello strumento, che viene usata per calcolare le unità di chemiluminescenza (CU) a partire dalle RLU ottenute per ogni paziente.

Presso Inova, viene prodotta una Curva master a sei punti per ogni nuovo lotto di QUANTA Flash DFS70. Questa curva logistica a quattro parametri è codificata nel codice a barre di ogni cartuccia di reagente. Dopo la calibrazione di una cartuccia di reagente, verrà utilizzata una curva di lavoro specifica della macchina per convertire RLU in CU.

La reattività dell'anticorpo per DFS70 può quindi essere classificata in base al range seguente:

Reattività CU Negativa <20

Positiva  $\geq 20$

La reattività in CU è direttamente collegata al titolo di autoanticorpi nel campione del paziente. Gli aumenti e le diminuzioni delle concentrazioni di anticorpi del paziente saranno rispecchiate in una corrispondente ascesa o diminuzione delle CU, proporzionale alla quantità di anticorpi.

## **Immunoblot (IB)**

L’immunoblot è stato usato come esame di terza istanza, per la determinazione della specificità anticorpale per il DFS70. Si tratta di un test qualitativo che consente la determinazione contemporanea di anticorpi diretti contro 16 differenti antigeni (nucleari, citoplasmatici e mitocondriali) che oltre al DFS70 comprendono: nRNP, Sm, SS-A, Ro-52, SS-B, Scl-70, PM-Scl, Jo-1, CENP B, PCNA, dsDNA, nucleosomi, istoni, proteina P-ribosomiale, AMA-M2. Per individuarli vengono usati antigeni altamente purificati coattati su strip forniti da EUROIMMUN (EUROLINE Profile 3 più DFS70).

I campioni dei pazienti sono stati diluiti 1:101 con il tampone di diluizione fornito dal Kit (15 µl di

siero in 1,5 ml di tampone) mentre le strip sono state pre-trattate immergendole nel tampone di diluizione su di un agitatore basculante per 5 minuti a temperatura ambiente (18°C-25°C). Successivamente ciascuna strip è stata incubata con 1,5 ml del campione diluito per 30 minuti a temperatura ambiente su un agitatore basculante. In questa fase gli anticorpi nel siero del paziente interagiscono con gli antigeni coattati su ciascuna strip. Dopo un lavaggio con 1,5 ml di tampone di lavaggio, diluito 1:10 con acqua distillata (1ml di tampone in 9 ml di acqua distillata), sono stati aggiunti 1,5 ml di coniugato (anticorpi anti-IgG umane coniugati con fosfatasi alcalina). Durante la successiva incubazione per 30 minuti il coniugato interagisce con gli anticorpi legati agli antigeni, mentre il lavaggio ha la funzione di rimuovere quella porzione in eccesso che non ha interagito. Le strip sono state quindi incubate per 10 minuti con 1,5 ml di substrato (Nitro blutetrazoliocloruro/5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato, NBT/BCIP) e lavate 3 x 1 minuto con acqua distillata. Il substrato è un cromogeno in grado di evidenziare gli anticorpi legati, in quanto interagendo con la fosfatasi alcalina ad essi coniugata promuove una reazione “colorata” che si rende evidente come una banda scura al livello corrispondente all'antigene riconosciuto. Dopo aver fatto asciugare le strip all'aria, è stata eseguita la lettura dei risultati attraverso scansione con uno scanner piano e valutazione con il software EUROLineScan che sulla base dell'intensità del segnale interpreta il risultato:

- intensità 0-5, nessun segnale: risultato Negativo 0
- intensità 6-10, banda molto debole: risultato Borderline (+)
- intensità 11-25 o 26-50, banda da media a forte: risultato Positivo +, ++
- intensità >50, banda molto forte con un'intensità confrontabile alla banda di controllo: risultato Molto Positivo +++

[61]

<b>CAMPIONI STUDIATI</b>	APS	116
	ABO	77
	TVP	130
	TA	68
	TR EPARINA	22
	<b>TOT CON TROMBOSI</b>	<b>413</b>

<b>GRUPPO CONTROLLI</b>	FA	99
	CONTR-EP	28
	DONATORI SANI	100
	<b>TOT CONTROLLI</b>	<b>220</b>

Tabella 2. Raccolta dei sieri inclusi nello studio

## Risultati

Dei 413 campioni studiati 23, corrispondente al 5,5% dei pazienti con eventi trombotici sono risultati positivi per DFS70 in immunofluorescenza, una percentuale sicuramente più bassa rispetto all'11,1% indicato nello studio francese.

Come si può vedere dalla tabella 3, anche nel nostro studio i pazienti con trombosi presentavano una prevalenza doppia rispetto i controlli, se studiati in immunofluorescenza, e tripla se analizzati in chemiluminescenza.

Come atteso, l'IFI ha molti positivi non confermati dal test, più specifico, in chemiluminescenza.

<b>Campioni studiati</b>		<b>IFI+</b>	<b>CLIA+</b>
APS	116	8	2
ABO	77	4	5
TVP	130	7	2
TA	68	3	1
TR-EPARINICA	22	1	1
<b><i>Totale con trombosi</i></b>	<b>413</b>	<b>23 (5,5%)</b>	<b>11 (2,7%)</b>
FA	92	3	2
CONTR-EPARINA	28	2	0
SANI	100	1	0
<b><i>Totale controlli</i></b>	<b>220</b>	<b>6 (2,7%)</b>	<b>2 (0,9%)</b>
<b>TOTALE GENERALE</b>	<b>633</b>	<b>29</b>	<b>13</b>
		4,6%	2,00%

Tabella 3. Campioni studiati

## Analisi dei sieri risultati positivi per DFS70, le positività totali

Guardando la sottostante tabella 4, ciò che appare immediatamente è che il gruppo con complicanze ostetriche è quello con una prevalenza totale di positività per DFS70, più elevata, sia rispetto al gruppo di controllo, sia rispetto agli altri gruppi dei patologici.

Analizzando la popolazione di controlli abbiamo:

- 7 positività totali per DFS70, di cui solo un siero risultato positivo in immunofluorescenza è stato riscontrato positivo in chemiluminescenza;
- 5 sieri con la sola positività in fluorescenza non sono stati confermati in chemiluminescenza.

Se analizziamo il totale di sieri con trombosi, nel totale sono 29 i sieri positivi per DFS70, di questi:

- 5 sono doppi positivi, quindi risultati positivi per DFS70 sia in immunofluorescenza che sia confermati dalla chemiluminescenza.
- 18 sieri positivi in immunofluorescenza, negativi in chemiluminescenza.
- 6 sieri positivi in chemiluminescenza e non vivibili in immunofluorescenza.

Campioni studiati		solo IFI+	solo CLIA+	Doppi +	Totale	%
APS	116	7	1	1	9	7,7
ABO	77	2	3	2	7	9,1
TVP	130	6	1	1	8	6,2
TA	68	3	1	0	4	5,9
TR-EPARINA	22	0	0	1	1	4,5
<b>Totale con trombosi</b>	<b>413</b>	<b>18 (4,3%)</b>	<b>6 (1,4%)</b>	<b>5 (1,2%)</b>	<b>29</b>	<b>7,0</b>
FA	92	2	1	1	4	4,3
CONTR-EPARINA	28	2	0	0	2	7,1
SANI	100	1	0	0	1	1,0
<b>Totale controlli</b>	<b>220</b>	<b>5 (2,3%)</b>	<b>1 (0,4%)</b>	<b>1 (0,4%)</b>	<b>7</b>	<b>3,2</b>
<b>TOTALE GENERALE</b>	<b>633</b>	<b>23</b>	<b>7</b>	<b>6</b>	<b>36</b>	<b>5,7</b>

Tabella 4, positività totali per DFS70

Data la discordanza osservata per alcuni sieri tra i risultati delle due metodiche, non potevamo esimerci dall'indagare il DFS70 con un metodo di terza istanza: immunoblot (IB). I risultati sono riportati in Tabella 5 .

Abbiamo potuto vedere che tutti i sieri doppi positivi, sia per l'immunofluorescenza che per la chemiluminescenza, si sono confermati positivi anche per i blot. Abbiamo quindi ottenuto una concordanza, tra i doppi e i tripli positivi, pari al 100%.

Analizzando invece i sieri con sola positività in chemiluminescenza, uno solo è risultato positivo in immunoblot. Si tratta di un paziente con trombosi venosa profonda il cui quadro fluoroscopico corrispondeva ad un centromerico ad alto titolo [Fig 8], quadro che potrebbe nascondere la positività per DFS70.

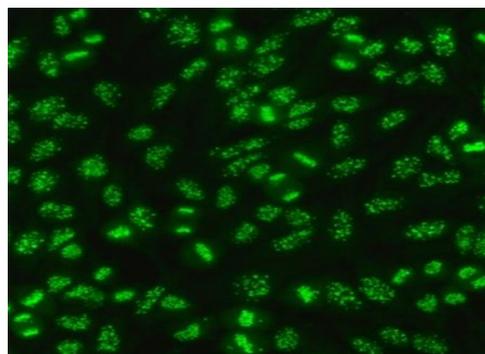
Altri 3 sieri positivi solo per la chemiluminescenza, e non per l'immunofluorescenza, sono risultati negativi in immunoblot, riportano però valori di CLIA appena sopra il cut off indicato dall'azienda produttrice del test. E' bene osservare che invece, si tratta di positività elevate quelle dei sieri che risultano essere tripli positivi.

Abbiamo inoltre 3 sieri positivi al CLIA e negativi in IFI sui quali non è stato ad oggi possibile eseguire IB per inquinamento dei sieri.

Dei 23 sieri positivi solo in IIF e non in CLIA, solo un siero si è confermato positivo anche in IB ed è attualmente in corso di accertamento/studio con dosaggi di altre aziende e in altri centri. Considerando i 23 sieri positivi in immunofluorescenza, negativi in chemiluminescenza, uno solo di questi 23 sieri si è confermato positivo in immunoblot. Si tratta di un siero di un paziente con trombosi venosa profonda, mentre i 22 sieri negativi in chemiluminescenza e positivi in fluorescenza sottintendevano in realtà altre positività autoanticorpali, si è visto che la maggior parte

Campioni positivi	No.	solo IFI+ blot+	solo CLIA+ blot+	Doppi+ blot+
APS	9	0/7	0/1	1/1
ABO	7	0/2	?/3	2/2
TVP	8	1/6	1/1	2/2
TA	4	0/3	0/1	0/0
TR-EPARINA	1	0	0	1/1
<b>Totale con trombosi</b>	<b>29</b>	<b>1/18 (5,5%)</b>	<b>1/3 (33,3%)</b>	<b>6/6 (100%)</b>
FA	4	0/2	0/1	1/1
CONTR-EPARINA	2	0/2	0	0
SANI	1	0/1	0	0
<b>Totale controlli</b>	<b>7</b>	<b>0/5</b>	<b>0/1</b>	<b>1/1 (100%)</b>
<b>TOTALE GENERALE</b>	<b>36</b>	<b>1/23 (4,3%)</b>	<b>?/7 (?%)</b>	<b>7/7 (100%)</b>

Tabella 5. Positività IFI CLIA immunoblot a confronto.



**Fig.8** Pattern fluoroscopico Nucleare Centromerico (AC-3) o Centromerico

sono sierici che hanno la positività o per SSA e/o per Ro52 e positività per RNP.

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI:

La determinazione degli ANA costituisce uno dei marcatori di malattia autoimmune da più tempo entrato nell'uso clinico, prototipicamente come criterio classificativo/diagnostico per il LES e per altre malattie autoimmuni sistemiche, ma anche per malattie autoimmuni d'organo (es. epatiti autoimmuni). In realtà fin dall'introduzione in diagnostica degli ANA è risultata evidente l'eterogeneità del marcatore, ovvero la molteplicità degli autoantigeni implicati nella positività ANA: la prima espressione di tale eterogeneità è stata l'individuazione di molteplici pattern fluoroscopici, che nel tempo si è cercato di caratterizzare in sempre maggior dettaglio: ad oggi il numero dei pattern fluoroscopici caratterizzati è dell'ordine delle decine, e il numero delle specificità autoantigeniche note è dell'ordine del centinaio, ma solo per una parte (non maggioritaria) è dimostrata una correlazione clinica utile ai fini diagnostici. Il progresso tecnologico (maggior sensibilità nella rilevazione del segnale fluoroscopico, espansione e miglioramento qualitativo delle metodiche volte a caratterizzare singole specificità antigeniche/associazioni di specificità antigeniche) ha indubbiamente contribuito a incrementare la disponibilità di informazioni, e a rendere più complesso il quadro di insieme. A ciò si aggiunga il fatto che nella formulazione attuale il termine "ANA" (in origine, "anticorpi anti-nucleo"), riferito all'uso delle metodiche in Immunofluorescenza indiretta su cellule HEP-2, è evoluto comprendendo anche la messa in evidenza di quadri fluoroscopici citoplasmatici (quindi, "anticorpi anti-antigeni intracellulari"), correlabili ad ulteriori situazioni cliniche,

Resta la considerazione fondamentale che la grande maggioranza dei molteplici quadri di malattia correlabili a positività ANA è a relativamente bassa prevalenza, mentre già da studi condotti un ventennio fa sappiamo che la prevalenza degli ANA nella popolazione generale è relativamente elevata. Quindi 1) esistono quadri fluoroscopici e specificità antigeniche ANA non correlate a quadri di malattia definiti 2) esiste comunque un'alta prevalenza di ANA "inaspettata" (in soggetti apparentemente senza segni, o con segni minimi di malattia) che pongono problemi di potenziale overdiagnosi, gestione clinica e di follow-up (62).

Come si è esposto nella parte introduttiva e come confermato dai dati ottenuti dallo studio della presente casistica multicentrica, il pattern fluoroscopico "Dense Fine Speckled" e la positività per

l'autoantigene DFS 70 sono frequenti e danno conto di una parte consistente delle positività ANA "inaspettate" e comunque senza un corrispettivo clinico chiaramente definito. E' quindi importante, anche per la pratica diagnostica, il tentativo di definirne il significato, e sono necessarie conferme su numeri significativi per avvalorare ipotesi in merito. Una serie di studi pubblicati (v. Introduzione) hanno ipotizzato correlazioni con svariate situazioni patologiche, quali malattie immuno-mediate a patogenesi non chiara, o malattie neoplastiche, ma senza raggiungere in nessun caso risultati di valore definitivo. E' stato inoltre preso in considerazione il possibile significato della positività anti-DFS70 come marcatore "negativo" di patologia autoimmune sistemica: di fatto, la monospecificità per anti-DFS70 sembra evento raro nei pazienti con ARD, ed è emersa la proposta di escludere, in caso di monospecificità anti-DFS70, il valore degli ANA come criterio diagnostico per LES (5)

Nello specifico dello scopo del presente lavoro, si è voluta indagare in maniera rigorosa l'ipotizzata relazione tra positività per autoanticorpi anti-DFS70 e trombofilia. Ricordiamo che i dati numericamente più consistenti a sostegno dell'esistenza di tale relazione derivano da uno studio su una casistica numericamente abbastanza consistente, ma monocentrica e comunque basata sui soli risultati della valutazione del pattern fluoroscopico, senza indagini con metodiche di conferma della positività anti-DFS 70. I criteri metodologici su cui si è basato il presente protocollo (studio multicentrico con raccolta di siero da 413 soggetti con eventi trombotici non post-traumatici, e da 220 controlli – donatori sani o soggetti in terapia anticoagulante a scopo profilattico, uso di metodologie multiple per evidenziare la specificità anti-DFS 70) sono stati volti a superare tali limiti.

I risultati ottenuti sono in qualche modo concordanti con lo studio francese precedentemente pubblicato: se infatti (ma impropriamente) prendiamo in considerazione tutte le positività in termini di pattern fluoroscopico, il gruppo di trombosi ha una frequenza doppia rispetto i controlli, raggiungendo la significatività statistica, la percentuale di positività nel gruppo del paziente con complicanze ostetriche è maggiore rispetto a tutti gli altri gruppi di patologia e controlli. (Tabella 6).

	<b>DFS70 +</b>	<b>DFS70 -</b>	<i>Marginal Row Totals</i>
<b>pz con trombosi</b>	29 (23.49) [1.29]	384 (389.51) [0.08]	413
<b>pz controllo e sani</b>	7 (12.51) [2.43]	213 (207.49) [0.15]	220
<i>Marginal Column Totals</i>	36	597	633 (Grand Total)

Tabella 6. Conclusioni improprie

Peraltro queste conclusioni risultano improprie, in quanto dai dati ottenuti risulta evidente che solo una parte dei pattern fluoroscopici Dense Fine Speckled risultano confermati da metodiche autoantigene-specifiche. Se prendiamo in considerazione solamente i casi con positività per anti-DFS 70 confermata con test antigene-specifici (doppi positivi), le differenze osservate tra campione di pazienti in esame e controlli non raggiungono la significatività statistica.

Quindi, questo studio, condotto su numeri elevati di campioni selezionati con criteri stringenti e confrontati con gruppi di controllo appropriati non permette di confermare l'esistenza di una relazione significativa tra positività per anti-DFS 70 e trombofilia. Nel contempo, evidenzia come il pattern fluoroscopico Dense Fine Speckled solo in una parte di casi sia indicativo di positività per anti-DFS 70.

Quindi, il significato clinico di questa positività rimane ancora elusiva: questo studio conferma la sua prevalenza relativamente elevata e l'importanza della sua individuazione, in quanto probabile "non-criterio" di ARD (anche se non vi sono le condizioni per definirlo criterio di esclusione). Resta il problema della definizione delle ulteriori possibili specificità autoantigeniche legate al pattern fluoroscopico Dense Fine Speckled, e in aggiunta del possibile significato della specificità anti-DFS 70 quando associata a altre specificità ANA significative sul piano patogenetico e diagnostico. La disponibilità e il consolidamento nell'uso delle metodiche specifiche (metodiche di secondo e terzo livello) impiegate nel presente studio potrà contribuire a fornire risposte a queste problematiche.

## Bibliografia:

- [1] Manfred H, Werner K, Luis E.C. A, Karsten C, Wilson de Melo C, Damoiseaux J, Fritzler M J., Carlos A. von Muhlen, Minoru S and Edward K.L. Chan.  
International Consensus on Antinuclear Antibody Patterns: defining negative results and reporting unidentified patterns. Clin Chem lab Med 2018; 1-2.
- [2] [www.anapatterns.org](http://www.anapatterns.org)
- [3] Antico A, Tampoia M. Gli autoanticorpi anti-antigeni intracellulari. In: Tozzoli R, Bizzaro N, Villalta D, Tonutti E, eds. *“Il laboratorio nelle malattie reumatiche autoimmuni”*. Bologna: Editrice Esculapio, 2016; pp 119-146
- [4] Meroni PL, Schur PH. ANA: an old test with new recommendation. Ann Rheum Dis. 2010;69:1420.
- [5] Cinquanta L, Bizzaro N, Villalta D, Morozzi G, Tonutti E, Bagnasco M, Pesce G, et al. Linee Guida per l'utilizzo dei test autoanticorpali nella diagnosi e nel monitoraggio della malattie autoimmuni reumatiche sistemiche. Revisione 2015. Riv Ital Med Lab. 2015;11:205.
- [6] Chan KL, Damoiseaux J, [Carballo OG](#) et al. Report of the first international consensus on standardized nomenclature of antinuclear antibody HEp-2 cell patterns 2014–2015. Front Immunol. 2015;6:412.
- [7] Ochs RL, Mahler M, Basu A, et al. The significance of autoantibodies to DFS70/LEDGFp75 in health and disease: integrating basic science with clinical understanding. Clin Exp Med. 2016;16:273.
- [8] Ochs RL, Muro Y, Si Y, Ge H, Chan EK, Tan EM. Autoantibodies to DFS70 kd/transcription coactivator p75 in atopic dermatitis and other conditions. J Allergy Clin Immunol. 2000;105:1211.
- [9] Ge H, Yuanzheng S, Roeder RG. Isolation of cDNAs encoding novel transcription coactivators p52 and p75 reveals an alternate regulatory mechanism of transcriptional activation. EMBO J. 1998;17:6723.
- [10] Singh DP, Ohguro N, Chylack LT Jr, Shinohara T. Lens epithelium-derived growth factor: increased resistance to thermal and oxidative stresses. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1999;40:1444.
- [11] Singh DP, Ohguro N, Kikuchi T, et al. Lens epithelium-derived growth factor: effects on growth and survival of lens epithelial cells, keratinocytes, and fibroblasts. Biochem Biophys Res Commun. 2000;267:373.
- [12] Ogawa Y, Sugiura K, Watanabe A, et al. Autoantigenicity of DFS70 is restricted to the conformational epitope of C-terminal alpha-helical domain. J Autoimmun. 2004;23:221.
- [13] Singh PK, Plumb MP, Ferris AL, et al. LEDGF/p75 interacts with mRNA splicing factors and targets HIV-1 integration to highly spliced genes. Gen Dev. 2015;29:2287.

- [14] [www.proteinatlas.org](http://www.proteinatlas.org)
- [15] Kubo E, Singh DP, Fatma N, et al. Cellular distribution of lens epithelium-derived growth factor (LEDGF) in the rat eye: loss of LEDGF from nuclei of differentiating cells. *Histochem Cell Biol.* 2003;119:289.
- [16] Sugiura K, Muro Y, Nishizawa Y, et al. LEDGF/DFS70, a major autoantigen of atopic dermatitis, is a component of keratohyalin granules. *J Invest Dermatol.* 2007;127:75.
- [17] Basu A, Rojas H, Banerjee H et al. Expression of the stress response oncoprotein in LEDGF/p75 in human cancer: a study of 21 tumor types. *PLoS One.* 2012;7(1):e30132.
- [18] Basu A, Sanchez TW, Casiano CA. DFS70/LEDGFp75: an enigmatic autoantigen at the interface between autoimmunity, AIDS, and cancer. *Front. Immunol.* 2015;6:116.
- [19] Morerio C, Acquila M, Rosanda C et al. t(9;11)(p22;p15) with NUP98-LEDGF fusion gene in pediatric acute myeloid leukemia. *Leuk Res.* 2005;29:467.
- [20] Daniels T, Zhang J, Gutierrez I, et al. Antinuclear autoantibodies in prostate cancer: immunity to LEDGF/p75, a survival protein highly expressed in prostate tumors and cleaved during apoptosis. *Prostate.* 2005;62:14.
- [21] Dugaard M, Baude A, Fugger K, et al. LEDGF (p75) promotes DNA-end resection and homologous recombination. *Nat Struct Mol Biol.* 2012;19:803.
- [22] Muro Y, Ogawa Y, Sugiura K, Tomita Y. HLA-associated production of anti-DFS70/LEDGF autoantibodies and systemic autoimmune disease. *J Autoimmun.* 2006;26:252.
- [23] Martini Pazini A, Fleck J, Souza dos Santos R, Beck R. Clinical relevance and frequency of cytoplasmic and nuclear dense fine speckled patterns observed in ANA-HEp-2. *Bras J Reumatol.* 2010;50(6):655.
- [24] Mariz HA, Sato EI, Barbosa SH, et al. Pattern on the antinuclear antibody-HEp-2 test is a critical parameter for discriminating antinuclear antibody-positive healthy individuals and patients with autoimmune rheumatic diseases. *Arthritis Rheum.* 2011;63:191.
- [25] Bentow C, Fritzler MJ, Mummert E, et al. Recognition of the dense fine speckled (DFS) pattern remains challenging: results from an international internet-based survey. *Autoimmun Highlights.* 2016;7:81.
- [26] Bizzaro N, Tonutti E, Villalta D, et al. Recognizing the dense fine speckled, lens epithelium-derived growth factor, p75 pattern on HEP-2 cells: not an easy task! Comment on the article by Mariz. *Arthritis Rheum.* 2011;63:4036.
- [27] Bizzaro N, Tonutti E, Tampona M, et al. Specific chemoluminescence and immunoadsorption tests for anti-DFS70 antibodies avoid false positive results by indirect immunofluorescence. *Clin Chim Acta.* 2015;451(Pt B):271.

- [28] Bizzaro N, Tonutti E, Visentini D, et al., Antibodies to the lens and cornea in anti-DFS70-positive subjects. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2007;1107:174.
- [29] Basu A, Woods-Burnham L, Ortiz G, et al. Specificity of antinuclear autoantibodies recognizing the dense fine speckled nuclear pattern: Preferential targeting of DFS70/LEDGFp75 over its interacting partner MeCP2. *Clin Immunol.* 2015;161:241.
- [30] Bizzaro N, Pesente F, Cucchiario F, et al. Anti-DFS70 antibodies detected by immunoblot methods: A reliable tool to confirm the dense fine speckles ANA pattern. *J Immunol Methods.* 2016;436:50.
- [31] Muro Y. Autoantibodies in atopic dermatitis. *J Dermatol Sci.* 2001;25:171
- [32] Ganapathy V, Casiano CA. Autoimmunity to the nuclear autoantigen DFS70 (LEDGF): what exactly are the autoantibodies trying to tell us? *Arthritis Rheum.* 2004;50:684.
- [33] Yamada K, Senju S, Shinohara T, et al. Humoral immune response directed against LEDGF in patients with VKH. *Immunol Lett.* 2001;78:161.
- [34] Chin MS, Caruso RC, Detrick B, Hooks JJ. Autoantibodies to p75/LEDGF, a cell survival factor, found in patients with atypical retinal degeneration. *J Autoimmun.* 2006;27:17.
- [35] Ayaki M, Ohguro N, Azuma N, et al. Detection of cytotoxic anti-LEDGF autoantibodies in atopic dermatitis. *Autoimmunity.* 2002;35:319.
- [36] Ayaki M, Sueno T, Singh DP, Chylack LT Jr, Shinohara T. Antibodies to lens epithelium-derived growth factor (LEDGF) kill epithelial cells of whole lenses in organ culture. *Exp Eye Res.* 1999;69:139.
- [37] Okamoto M, Ogawa Y, Watanabe A, et al. Autoantibodies to DFS70/LEDGF are increased in alopecia areata patients. *J Autoimmun.* 2004;23:257.
- [38] Dellavance A, Viana VS, Leon EP, et al. The clinical spectrum of antinuclear antibodies associated with the nuclear dense fine speckled immunofluorescence pattern. *J Rheumatol.* 2005;32:2144.
- [39] Watanabe A, Kodera M, Sugiura K, et al. Anti-DFS70 antibodies in 597 healthy hospital workers. *Arthritis Rheum.* 2004;50:892.
- [40] Buchner C, Sachs U, Bein G, et al. Significant variations in the prevalence of anti-DFS70 antibodies in blood donors from six countries: USA, Italy, Spain, Germany, United Kingdom and Brazil. 27th Annual AMLI Meeting. 2014.
- [41] Conrad K, Röber N, Andrade LE, Mahler M. The Clinical relevance of anti-DFS70 autoantibodies. *Clinic Rev Allerg Immunol.* doi10.1007/s12016-016-8564-5.
- [42] Nilsson AC, Voss A†, Lillevang ST. DFS70 autoantibodies are rare in healthy danish individuals but may still serve as a diagnostic aid. *Scand J Immunol.* 2015;82:547.

- [43] Vazquez-Del Mercado M, Gomez-Banuelos E. Detection of autoantibodies to DFS70/LEDGFp75 in Mexican Hispanics using multiple complementary assay platforms. *Autoimmun Highlights*. doi10.1007/s13317-016-0089-7.
- [44] Mahler M, Parker T, Peebles CL, et al. Anti-DFS70/LEDGF antibodies are more prevalent in healthy individuals compared to patients with systemic autoimmune rheumatic diseases. *J Rheumatol*. 2012;39:2104.
- [45] Muro Y, Sugiura K, Nakashima R, Mimori T, Akiyama M. Low prevalence of anti-DFS70/LEDGF antibodies in patients with dermatomyositis and other systemic autoimmune rheumatic diseases. *J Rheumatol*. 2013;40:92.
- [46] Muro Y, Sugiura K, Morita Y, Tomita Y. High concomitance of disease marker autoantibodies in anti-DFS70/LEDGF autoantibody-positive patients with autoimmune rheumatic disease. *Lupus*. 2008;17:171.
- [47] Gundi S, Irure-Ventura J, Asensio E, et al. Measurement of anti-DFS70 antibodies in patients with ANA-associated autoimmune rheumatic diseases suspicion is cost-effective. *Autoimmun Highlights*. 2016;7:10.
- [48] Mahler M, Hanly JG, Fritzler MJ. Importance of the dense fine speckled pattern on HEp-2 cells and anti-DFS70 antibodies for the diagnosis of systemic autoimmune diseases. *Autoimmun Rev*. 2012;11:642.
- [49] Bentow C, Rosenblum R, Correia P, et al. Development and multi-center evaluation of a novel immunoabsorption method for anti-DFS70 antibodies. *Lupus*. 2016;25:897.
- [50] Infantino M, Meacci F, Grossi V, et al. The clinical impact of Anti-DFS70 antibodies in undifferentiated connective tissue disease: case reports and a review of the literature. doi10.1007/s12026-016-8836-4.
- [51] Marlet J, Ankri A, Charuel JL, et al. Thrombophilia associated with anti-DFS70 autoantibodies. *PLoS One* 2015;10:e0138671.
- [52] Mahler M, Meroni PL, Andrade LE, et al. Towards a better understanding of the clinical association of anti-DFS70 autoantibodies. *Autoimmun Rev*. 2016;15:198.
- [53] Schmeling H, Mahler M, Levy DM, et al. Autoantibodies to dense fine speckles in pediatric diseases and controls. *J Rheumatol*. 2015;42:2419.
- [54] Sperotto F, Seguso M, Gallo N, Plebani M, Zulian F. Anti-DFS70 antibodies in healthy schoolchildren: A follow-up analysis. *Autoimmun Rev*. 2017;16:210.
- [55] Fabris M, Zago S, Tosolini R, Melli P, Bizzaro N, Tonutti E. Anti-DFS70 Antibodies: A Useful Biomarker in a Pediatric Case With Suspected Autoimmune. *Disease Pediatrics*. 2014;134:e1706.
- [56] Kuwabara N, Itoh Y, Igarashi T, Fukunaga Y. Autoantibodies to lens epithelium-derived growth

factor/transcription co-activator P75 (LEDGF/P75) in children with chronic nonspecific complaints and with positive antinuclear antibodies. *Autoimmunity*. 2009;42(6):492.

[57] Watanabe K, Muro Y, Sugiura K, Tomita Y. IgE and IgG(4) autoantibodies against DFS70/LEDGF in atopic dermatitis. *Autoimmunity*. 2011;44:511.

[58] Fritzler MJ, Clarke AE, St Pierre Y, et al. The prevalence and determinants of anti-DFS70 autoantibodies in an international inception cohort of systemic lupus erythematosus patients. *Lupus*. 2017;0:1.

[59] EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika GA. IFA Mosaic: Hep-2 cells/primate liver. FA 1512-20.

[60] INOVA Diagnostics a Werfen Company. QUANTA Flash DFS70. REF 701268

[61] EUROIMMUN Medizinische Labordiagnostika GA. EUROLINE ANA Profile 3 plus DFS70. DL 1590-30 G.

[62] Bagnasco M, Grassia L, Pesce G. The management of the patient with unexpected autoantibody positivity. , *Autoimmunity Reviews*, 2007;6:347-53