

LAVORO ORIGINALE

Anticorpi anti-cromatina in corso di artrite reumatoide giovanile*

Anti-chromatin antibodies in juvenile rheumatoid arthritis

F. Ingegnoli, N. Del Papa, E. Lupi, D.P. Comina, W. Maglione, V. Gerloni, F. Fantini

Cattedra di Reumatologia, Istituto Gaetano Pini, Milano

SUMMARY

Objective: to evaluate the prevalence and clinical significance of anti-chromatin antibodies (Abs) in juvenile rheumatoid arthritis (JRA).

Methods: IgG anti-chromatin Abs were detected by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), in sera of 94 children with JRA (10 children with systemic, 38 with polyarticular and 46 with oligoarticular disease onset). As control group, 33 age- and-sex-matched healthy children (HC) were also examined.

Results: Abs to chromatin were detected in 24/94 (25,5%) of children suffering from JRA. Particularly, the higher prevalence of anti-chromatin Abs has been found in children with oligoarticular (30,4%) and polyarticular (23,7%) onset JRA. In these groups Abs titers were significantly higher compared to systemic JRA and HC ($p=0.003$). Anti-chromatin Abs were observed more frequently in patients with oligoarticular disease and chronic uveitis (21,7%). Furthermore, higher levels of anti-chromatin Abs has been found in all the patients treated with anti-TNF α therapy ($p<0.0001$).

Conclusions: our results confirm previous data about the prevalence of anti-chromatin Abs in JRA. These Abs were significantly higher in the group of patients with oligoarticular onset with past or present history of ocular involvement and in the group with polyarticular JRA treated with biologic therapy. A long-term follow-up study could be useful to evaluate the potential utility of these autoantibodies.

Reumatismo, 2003; 55(4):240-244

INTRODUZIONE

Le malattie reumatiche sistemiche sono malattie infiammatorie croniche a patogenesi autoimmune, caratterizzate da diverse manifestazioni cliniche e dalla presenza in circolo di autoanticorpi. Nell'ambito del grande numero di specificità autoanticorpali note in queste patologie, ve ne sono alcune che definiscono in modo esclusivo alcune malattie e/o si correlano con la presenza di determinati segni e sintomi (1). In particolare, in corso di artrite reumatoide giovanile (ARG) il fattore reumatoide risulta positivo solamente in una piccola percentuale di bambini con esordio poliarticolare, mentre la presenza degli anticorpi antinu-

cleari (ANA) è relativamente frequente nel gruppo con esordio oligoarticolare ed interessamento oculare (2-4).

È stato ipotizzato che in corso di malattie autoimmuni, la risposta immunitaria sia stimolata da antigeni derivati dalla liberazione, conseguente ad un danno tessutale, di materiale cellulare o dalla disregolazione dei meccanismi che presiedono all'apoptosi (5, 6). Uno di questi potenziali autoantigeni è la cromatina, formata da unità fondamentali chiamate nucleosomi; ogni nucleosoma è formato da un tratto di DNA a doppia elica, che si avvolge per due volte attorno ad un nucleo, costituito da otto molecole, due copie per ognuno dei quattro tipi di istoni (H2A, H2B, H3 e H4). Nel filamento di cromatina ogni nucleosoma è unito a quello vicino da un tratto di DNA interposto detto "linker". Tra ogni nucleosoma e il DNA linker è interposta una molecola di istone H1 che si lega ad una specifica zona del nucleosoma in modo da assemblarli in una struttura regolare e ripetitiva (7, 8). In letteratura sono presenti segnalazioni riguardan-

*Lavoro premiato al XXXIX Congresso SIR di Bari, 2002

Indirizzo per la corrispondenza:

Dott.ssa Francesca Ingegnoli
Cattedra di Reumatologia, Istituto Gaetano Pini
Via G. Pini 9, 20122 Milano
E-mail: francescaingegnoli@yahoo.com

ti la presenza di anticorpi rivolti verso la cromatina o i singoli istoni (9-13), in particolare ci sono alcune segnalazioni riguardanti la correlazione tra la presenza degli autoanticorpi anti-H3 e anti-antigene S (soluble retinal antigen) e l'interessamento oculare (14). È stata dimostrata infatti un'omologia nella sequenza amino acidica tra l'istone 3 e l'antigene S, che sembra svolgere un ruolo importante nella patogenesi dell'uveite in modelli animali (15). Da un nostro precedente studio in cui avevamo indagato la frequenza e alcune possibili correlazioni cliniche degli anticorpi anticromatina nei reumatismi cronici giovanili, era emersa una prevalenza maggiore di questi anticorpi nei pazienti con esordio oligoarticolare di malattia e uveite cronica (16). In questo studio abbiamo voluto, ampliando la casistica, riconfermare i dati sulla prevalenza degli anticorpi anti-cromatina nell'ARG (16) e, successivamente, analizzare le possibili correlazioni tra la positività e il titolo anticorpale e le particolari caratteristiche cliniche di questi pazienti, valutando il comportamento di questi marcatori biologici in relazione ai provvedimenti terapeutici adottati.

MATERIALI E METODI

Casistica: sono stati studiati 94 bambini affetti da ARG in cura presso l'ambulatorio di Reumatologia Infantile dell'Istituto Ortopedico Gaetano Pini. La malattia, diagnosticata secondo i criteri ACR (17), era esordita con forma sistemica in 10 pazienti, poliarticolare in 38 e oligoarticolare in 46

casi. L'età media dei pazienti con ARG era di 15.5 anni e la durata media di malattia era di 4.5 anni. Inoltre sono stati esaminati 33 controlli sani di comparabile sesso ed età. Nessuno dei pazienti con forma poliarticolare o sistemica aveva interessamento oculare, mentre dei bambini con forma oligoarticolare 17 su 46 avevano una storia di uveite anteriore cronica, ma in nessun paziente l'interessamento oculare era in fase attiva al momento del prelievo. Sei pazienti con ARG poliarticolare erano in terapia con farmaci biologici anti-TNF α (4 con Infliximab e 2 con Etanercept).

Metodi: i sieri studiati sono stati ottenuti, dopo consenso informato dei genitori, durante un prelievo fatto per controlli di routine. Le provette sono state centrifugate ed i sieri conservati a -20°C. Gli anticorpi anti-cromatina sono stati rilevati con metodo ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) utilizzando un kit commerciale (Quanta Lite™ Histone, INOVA Diagnostics, San Diego). I sieri testati sono stati considerati negativi per valori inferiori a 20 Units.

Analisi statistica: per l'analisi statistica sono stati utilizzati il test chi-quadro o, quando appropriato, il test esatto di Fisher.

RISULTATI

Nella prima parte dello studio, abbiamo voluto confermare, su una casistica più ampia, i risultati ottenuti in un nostro precedente lavoro (16). Abbiamo infatti osservato che la prevalenza degli anticorpi

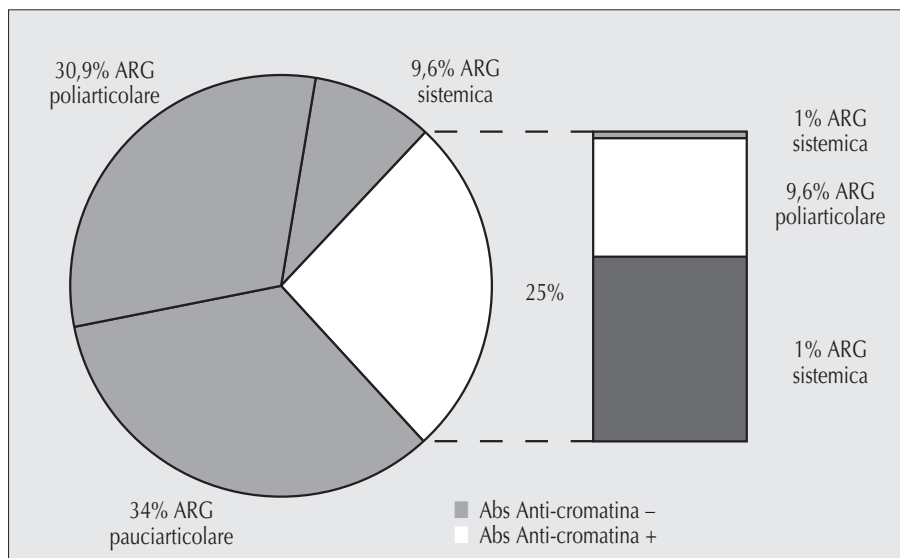


Figura 1 - Prevalenza degli anticorpi anti-cromatina in una popolazione di 94 pazienti con ARG.

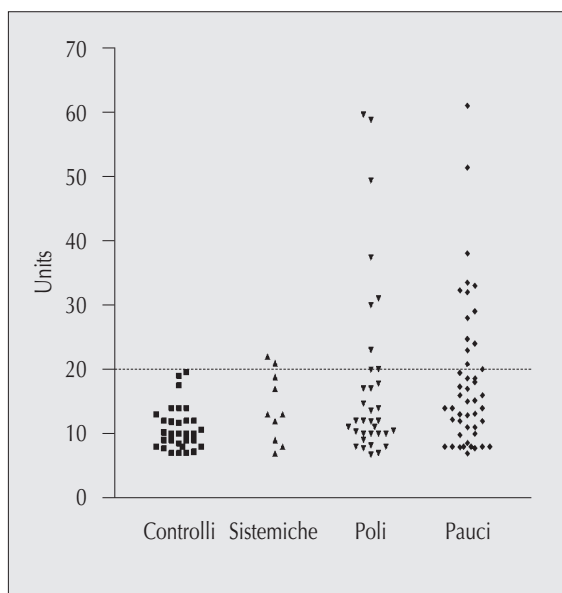


Figura 2 - Titolo degli anticorpi anti-cromatina nelle diverse forme di esordio dell'ARG (sistemica, poliarticolare e pauciarticolare). La linea orizzontale tratteggiata rappresenta il valore di cut off.

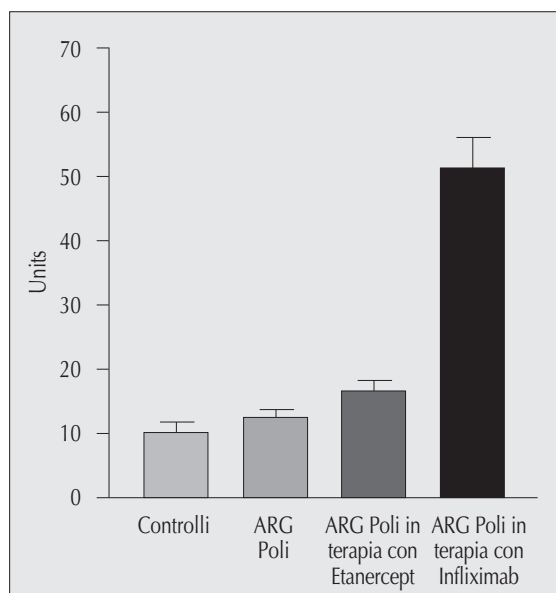


Figura 3 - Titolo degli anticorpi anti-cromatina nei pazienti con forma di esordio poliarticolare.

anti-cromatina in una popolazione di 94 pazienti con ARG era del 25,5% (Fig. 1), mentre non si osservavano anticorpi anti-cromatina nel gruppo di controllo. In particolare, la positività di questi anticorpi era pari al 10% (1/10) nei pazienti con esordio sistemico, al 23,7% (9/38) nella variante poliarticolare e al 30,4% (14/46) nella forma pauciarticolare. Inoltre, come mostra la figura 2, il titolo di questi anticorpi era significativamente maggiore nei gruppi con esordio poliarticolare e pauciarticolare rispetto ai pazienti con forma sistemica e ai controlli sani ($p=0.003$).

Successivamente, analizzando le caratteristiche cliniche di questi pazienti, abbiamo confermato che all'interno del gruppo ad esordio pauciarticolare, la maggioranza dei pazienti positivi per gli anticorpi anti-cromatina era quella con l'interessamento oculare (Tab. I) (16).

Gli anticorpi anti-cromatina sono risultati positivi

anche nel 23,7% (9/38) del gruppo con esordio poliarticolare. In particolare, tre di questi pazienti avevano un titolo anticorpale moderatamente elevato (media \pm S.E. 26.33 ± 9.6), mentre i rimanenti sei mostravano livelli significativamente maggiori (media \pm S.E. 41.5 ± 7.3). Un'analisi delle caratteristiche di quest'ultimo gruppo di pazienti, ha evidenziato che si trattava dei pazienti in terapia con farmaci biologici anti-TNF α (4 con Infliximab e 2 con Etanercept). In particolare, il titolo degli anticorpi anti-cromatina risultava significativamente più alto nei pazienti in terapia con Infliximab, sia rispetto ai pazienti trattati con Etanercept e ai rimanenti con esordio poliarticolare di malattia, sia al gruppo di controllo ($p<0.0001$) (Fig. 3). Questi pazienti risultavano positivi anche per gli anticorpi anti- double stranded DNA, in assenza però di manifestazioni cliniche che facessero sospettare un Lupus indotto da farmaci.

Tabella I - Prevalenza degli anticorpi anti-cromatina nelle forme ad esordio pauciarticolare con e senza interessamento oculare.

	Anticorpi anti-cromatina +	Anticorpi anti-cromatina -
ARG con interessamento oculare	21,7% (10/46)	13% (6/46)
ARG senza interessamento oculare	6,5% (3/46)	58,8% (27/46)

DISCUSSIONE

In questo studio la prevalenza degli anticorpi anti-cromatina è risultata maggiore nei pazienti con ARG rispetto al gruppo di controllo e il loro titolo era particolarmente elevato nel gruppo ad esordio oligoarticolare con interessamento oculare ed in quelli con forma poliarticolare in trattamento con farmaci biologici anti-TNF α .

Questi risultati ottenuti su un maggior numero di pazienti, confermano in parte quelli ottenuti in un nostro precedente lavoro per quanto riguarda l'associazione tra la presenza questi anticorpi presenti ad un titolo medio-alto e l'ARG ad esordio oligoarticolare con iridociclite (16), mentre non era emersa la presenza di questi anticorpi nei pazienti in terapia con farmaci anti-TNF α (Infliximab), pur in assenza di manifestazioni cliniche di Lupus indotto da farmaci.

In corso di ARG e di Lupus Eritematoso Sistemico (LES) il processo fisiologico di morte cellulare programmata sembra essere alterato a vari livelli ed i nucleosomi rappresentano uno dei prodotti principali che derivano dalla degradazione della cromatina durante l'apoptosi (18, 19). È stato anche dimostrato in recenti studi il ruolo fondamentale dei nucleosomi come immunogeni in vivo e come mediatori del danno tissutale, in particolare renale, nel LES (20-22). Infatti in questa patologia sono stati osservati frequentemente nello stesso paziente la presenza di autoanticorpi anti-istone ed anti-nDNA ed è stata avanzata l'ipotesi che queste due popolazioni anticorpali siano strettamente correlate

fra loro e che derivino in vivo dalla risposta ad un unico antigene, formato da DNA a doppia elica e istoni, cioè il nucleosoma.

Inoltre, è stata ben descritta la capacità dell'infliximab di interferire con il processo di apoptosi cellulare (23) e di indurre la formazione di autoanticorpi, come gli ANA, gli anti-dsDNA e gli anticorpi anti-nucleosomi (24).

In corso di ARG è ben documentata in letteratura l'associazione tra la componente articolare e l'interessamento oculare (25-28). L'uveite anteriore ha un esordio insidioso e generalmente asintomatico prima dello sviluppo delle complicanze. Considerando che l'uveite anteriore cronica non granulomatosa è tra le manifestazioni extra-articolari più gravi e invalidanti in corso di ARG, sarebbe importante disporre di strumenti che permettano di individuare i pazienti che sono più a rischio per questo tipo di manifestazione.

I nostri dati confermano quelli già presenti in letteratura circa la presenza degli anticorpi anti-cromatina nei pazienti con ARG. Uno studio di follow-up potrebbe essere utile per valutare l'effettivo ruolo di questi anticorpi nella diagnosi, classificazione e prognosi di questa malattia.

BIBLIOGRAFIA

1. von Muhlen CA, Tan EM. Autoantibodies in the diagnosis of systemic rheumatic diseases. *Semin Arthritis Rheum* 1995; 24: 323-58.
2. Lawrence III JM, Moore TL, Osborn TG, Neshor G, Madson KL, Kinsella MB. Autoantibody studies in ju-

RIASSUNTO

Introduzione: abbiamo valutato la prevalenza degli anticorpi anti-cromatina in pazienti con artrite reumatoide giovanile (ARG) ed indagare le possibili correlazioni tra il titolo anticorpale e le caratteristiche di questi pazienti.

Metodi: sono stati esaminati i sieri di 94 bambini con ARG diagnosticata secondo i criteri ACR (10 con forma sistemica, 38 con esordio poliarticolare e 46 oligoarticolare), e 33 controlli sani. Gli anticorpi anti-cromatina sono stati rilevati con metodo ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay).

Risultati: gli anticorpi anti-cromatina erano presenti nel 25,5% (24/94) pazienti con ARG; in particolare, nel 30,4% dei bambini con ARG ad esordio oligoarticolare e nel 23,7% di quelli con forma poliarticolare. In questi due gruppi la prevalenza e il titolo erano significativamente maggiori rispetto al gruppo con ARG ad esordio sistemico ed ai controlli sani ($p < 0.003$). In particolare, nel gruppo di bambini con forma pauciarticolare ed interessamento oculare la prevalenza degli anticorpi anti-cromatina era del 21,7%. Il titolo degli anticorpi anti-cromatina risultava significativamente più alto nei pazienti in terapia con farmaci biologici anti-TNF α sia rispetto al gruppo di controllo, sia ai rimanenti pazienti con esordio poliarticolare, oligoarticolare e sistemico ($p < 0.0001$).

Conclusioni: i nostri dati confermano quelli già presenti in letteratura circa la presenza degli anticorpi anti-cromatina nei pazienti con ARG. Uno studio di follow-up potrebbe essere utile per valutare l'effettivo ruolo di questi anticorpi nella diagnosi, classificazione e prognosi di questa malattia.

Parole chiave - Artrite reumatoide giovanile, anticorpi anti-cromatina.

Key words - Juvenile rheumatoid arthritis, anti-chromatin antibody.

- venile rheumatoid arthritis. *Semin Arthritis Rheum* 1993; 22: 265-74.
3. Schaller JG, Johnson GD, Holborow EJ, Ansell BM, Smiley WK. The association of antinuclear antibodies with the chronic iridocyclitis of juvenile rheumatoid arthritis (Still's disease). *Arthritis Rheum* 1974; 17: 409-16.
 4. Rosenberg AM. Clinical association of antinuclear antibodies in juvenile rheumatoid arthritis. *Clin Immunol Immunopathol* 1988; 49: 19-27.
 5. Tax WJM, Kramers C, van Bruggen MCJ, Berden JHM. Apoptosis, nucleosomes, and nephritis in systemic lupus erythematosus. *Kidney Int* 1995; 48: 666-73.
 6. Casciola-Rosen LA, Anhalt G, Rosen A. Autoantigen targeted in systemic lupus erythematosus are clustered in two populations of surface structures on apoptotic keratinocytes. *J Exp Med* 1994; 179: 1317-30.
 7. Bavykin SG, Usachenko SI, Zalensky AO, Mirzabekov Z. Structure of nucleosomes and organization of internucleosomal DNA in chromatin. *J Mol Biol* 1990; 212: 595-611.
 8. Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 1997; 389: 251-60.
 9. Monestier M, Losman JA, Fasy TM, Debbas ME, Massa M, Albani S, et al. Antihistone antibodies in antinuclear antibody-positive juvenile arthritis. *Arthritis Rheum* 1990; 33: 1836-41.
 10. Pauls JD, Silverman E, Laxer RM, Fritzler MJ. Antibodies to histones H1 and H5 in sera of patients with juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1989; 32: 877-83.
 11. Burlingame RW, Rubin RL, Rosenberg AM. Autoantibodies to chromatin components in juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1993; 36: 836-41.
 12. Ostensen M, Fredriksen K, Kass E, Rekvig OP. Identification of antihistone antibodies in subsets of juvenile chronic arthritis. *An Rheum Dis* 1989; 48: 114-117.
 13. Leak AM, Tuailon N, Muller S, Woo P. Study of antibodies to histones and histone synthetic peptides in pauciarticular juvenile chronic arthritis. *Br J Rheumatol* 1993; 32: 426-31.
 14. Rosenberg AM, Hauta SA, Prokopchuk PA, Romanchuk KG. Studies on associations of antinuclear antibodies with antibodies to an uveitogenic peptide of retinal S antigen in children with uveitis. *J Rheumatol* 1996; 23: 370-3.
 15. Singh VK, Yamaki K, Donoso LA. Sequence homology between yeast histone H3 and uveitopathogenic site of S-antigen: lymphocyte cross-reaction and adoptive transfer of the disease. *Cell Immunol* 1989; 119: 211-21.
 16. Ingegnoli F, Del Papa N, Comina DP, Maglione W, Lupi E, Gerloni V, et al. Autoantibodies to chromatin: prevalence and clinical significance in juvenile rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol*.
 17. Brewer EJ Jr, Bass J, Baum J, Cassidy JT, Fink C, Jacobs J, et al. Current proposed revision of JRA criteria. *Arthritis Rheum* 1977; 20(Suppl 2): 195-199.
 18. Amoura Z, Piette JC, Bach JF, Koutouzov S. The key role of nucleosomes in lupus. *Arthritis Rheum* 1999; 42: 833-43.
 19. Sioud M, Mellbye O, Forre O. Analysis of the NF-kappa B p65 subunit, Fas antigen, Fas ligand and Bcl-2-related proteins in the synovium of RA and polyarticular JRA. *Clin Exp Rheumatol* 1998; 16: 125-34.
 20. Licht R, van Bruggen MCJ, Oppers-Walgreen B, Rijke TPM, Berden JHM. Plasma levels of nucleosome - autoantibody complexes in murine lupus. *Arthritis Rheum* 2001; 44: 1320-30.
 21. Chabre H, Amoura Z, Piette JC, Godeau P, Bach JF, Koutouzov S. Presence of nucleosome-restricted antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1995; 38: 1485-91.
 22. Cohen MG, Webb J. Antihistone antibodies in rheumatoid arthritis and Felty's syndrome. *Arthritis Rheum* 1989; 32: 1319.
 23. Ohshima S, Mima T, Sasai M, Nishioka K, Shimizu M, Murata N, et al. Tumour necrosis factor alpha (TNF-alpha) interferes with Fas-mediated apoptotic cell death on rheumatoid arthritis (RA) synovial cells: a possible mechanism of rheumatoid synovial hyperplasia and a clinical benefit of anti-TNF-alpha therapy for RA. *Cytokine* 2000; 12: 281-8.
 24. De Rycke L, Kruithof E, Van Damme N, Hoffman IE, Van den Bossche N, Van den Bosch F, et al. Antinuclear antibodies following infliximab treatment in patients with rheumatoid arthritis or spondylarthropathy. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 1015-23.
 25. Southwood TR, Rayder CAJ. Ophthalmologic screening in juvenile arthritis: should the frequency of screening be based on the risk of developing chronic iridocyclitis? *Br J Rheumatol* 1992; 31: 663-4.
 26. Rosenberg AM, Oen KG. The relationship between ocular and articular disease activity in children with juvenile rheumatoid arthritis and associated uveitis. *Arthritis Rheum* 1986; 29: 797-800.
 27. Berk AT, Kocak N, Unsal E. Uveitis in juvenile arthritis. *Ocul Immunol Inflamm* 2001; 9: 243-51.
 28. Edelsten C, Lee V, Bentley CR, Kanski JJ, Graham EM. An evaluation of baseline risk factors predicting severity in juvenile idiopathic arthritis associated uveitis and other chronic anterior uveitis in early childhood. *Br J Ophthalmol* 2002; 86: 51-6.