

LAVORO ORIGINALE

Gli autoanticorpi antinucleo, anti-dsDNA anti-ENA nei pazienti con artrite reumatoide o spondilite anchilosante in trattamento con infliximab

Antinuclear, anti-dsDNA and anti-ENA antibodies in patients affected with rheumatoid arthritis or ankylosing spondylitis during treatment with infliximab

A. Hoxha, A. Ruffatti, P. Grypiotis, M. Podswiadek, C. Botsios, U. Fiocco,
L. Punzi, S. Todesco

Cattedra e U.O. di Reumatologia, Università degli Studi di Padova

SUMMARY

Objective: We evaluated the induction and clinical significance of ANA, anti-dsDNA and anti-ENA during infliximab therapy in patients with Rheumatoid Arthritis (RA) or Ankylosing Spondylitis (AS).

Methods: We tested sera from 30 RA and 30 AS patients before and during treatment with infliximab. ANA and anti-dsDNA were determined by indirect immunofluorescence and anti-ENA by an "in house" counterimmunoelectrophoresis. Statistical analysis was performed by χ^2 and McNemar's tests and U-test of Mann-Whitney.

Results: Eight of the 30 RA patients and 1 of the 30 AS patients were positive for ANA before treatment with infliximab. Eighteen of the 22 (81.8%) negative patients with RA and 11 of the 29 (37.9%) negative patients with AS became positive for ANA during infliximab treatment. No ANA positive patients became negative during the therapy. The difference between ANA before and after treatment resulted significant in both RA and AS patients ($p=0.001$). The frequency of anti-dsDNA and anti-ENA did not change significantly from baseline, in both RA and AS patients. Acquired ANA positivity was not associated with clinical signs of lupus syndrome and was not correlated with adverse events. The mean values of ESR and CRP in RA patients who became positive for ANA were significantly decreased ($p=0.01$ and $p=0.02$ respectively).

Conclusions: Infliximab treatment induced a significant increase in the frequency of ANA in RA and AS patients. The significance of ANA development in these diseases is at present unknown. The significant decrease of ESR and CRP in RA patients who became positive for ANA after treatment should be investigated in a larger number of patients.

Reumatismo, 2006; 58(2):121-126

INTRODUZIONE

L'infliximab è un anticorpo monoclonale chimerico (75% umano e 25% murino) che viene impiegato nella terapia dell'Artrite Reumatoide (AR) e della Spondilite Anchilosante (SA) (1-4). Questo anticorpo presenta la capacità di legare in vitro il tumor necrosis factor- α (TNF- α), una citochina proinfiammatoria prodotta da macrofagi, mo-

nociti e cellule endoteliali. Questa citochina ha un ruolo chiave nel mediare l'infiammazione e si suppone che abbia anche un'attività immunoregolatoria (5) mediante attivazione linfocitaria, aumento dell'espressione di molecole di adesione e migrazione transendoteliale dei leucociti. Questa citochina può essere presente sia in forma solubile che legata alla membrana cellulare. Il legame tra l'anticorpo e il TNF- α solubile provoca la perdita della sua bioattività, mentre il legame con il TNF- α transmembrana induce citotossicità per attivazione del complemento o formazione di autoanticorpi (6). Vi è ormai consenso (5, 7, 8-14) sulla capacità dell'infliximab di indurre autoanticorpi, in particolare antinucleo (ANA), anti-double stranded (ds) DNA ed in minor misura anti-antigeni nucleari

Indirizzo per la corrispondenza:
Prof.ssa Amelia Ruffatti
Cattedra e U.O. di Reumatologia
Policlinico Universitario
Via Giustiniani 2, 35128 Padova
E-mail: amelia.ruffatti@unipd.it

estraibili (ENA) sia nell'AR che nella SA. Il significato della induzione di tali autoanticorpi da parte dell'infliximab è al presente sconosciuto (8). Solo raramente il loro aumento è stato correlato con la comparsa degli effetti collaterali dell'infliximab (5). Inoltre generalmente la positivizzazione degli ANA ed anti-dsDNA non è accompagnata dalle tipiche manifestazioni cliniche del LES da farmaci come febbre, artralgie, artrite e dermatite (5, 7, 10).

In questo lavoro ci siamo proposti di verificare l'induzione degli ANA, degli anti-dsDNA e degli anti-ENA da parte dell'infliximab in pazienti affetti da AR e SA, nonché di definire le caratteristiche degli anticorpi comparsi dopo il trattamento. Inoltre abbiamo esaminato il significato clinico della comparsa di tali autoanticorpi attraverso la loro correlazione con gli effetti collaterali del farmaco e la sua efficacia.

PAZIENTI E METODI

Sono stati studiati due gruppi di pazienti trattati ambulatoriamente con infliximab tra Giugno 2000 e Gennaio 2005, presso la Cattedra e U.O. di Reumatologia dell'Università di Padova.

Il primo gruppo comprendeva 30 pazienti, 6 uomini e 24 donne, con età media di 51,9 anni \pm 12,9 deviazioni standard (DS), affetti da AR, diagnosticata sulla base dei criteri ACR (15). Essi presentavano una durata media di malattia di 144 mesi \pm 78 DS e avevano un follow-up di trattamento di 41 mesi \pm 11,8 DS. Il secondo gruppo era costituito da 30 pazienti, 25 uomini e 5 donne, con età media di 35 anni \pm 11,5 DS affetti da SA, diagnosticata in accordo con i criteri di New York modificati (16). Essi presentavano una durata media di malattia di 122,6 mesi \pm 102,4 DS e un follow-up di trattamento di 15,5 mesi \pm 9,9 DS. Dopo le dosi di induzione, i pazienti sono stati trattati con 3 mg/kg di infliximab endovena ogni 6-8 settimane. In tutti quelli con AR, ad esclusione di uno, sono stati associati altri farmaci; in particolare 25 (83,3%) assumevano methotrexate a dosaggio variabile tra 7,5 e 10 mg/settimana, 13 (43,3%) metilprednisolone a dosaggio variabile tra 4 e 16 mg/die, 12 (40%) farmaci antinfiammatori non steroidei (FANS), 1 (3,3%) ciclosporina A, 1 (3,3%) azatioprina ed 1 (3,3%) leflunomide. I pazienti con SA assumevano in associazione ad infliximab rispettivamente 15 (50%) methotrexate al dosaggio variabile 7,5 e 10 mg/settimana, 9 (30%) FANS, 7

(23,3%) metilprednisolone al dosaggio variabile tra 4 e 16 mg/die, 2 (6,6%) azatioprina, 2 (6,6%) ciclosporina A e 2 (6,6%) salazopirina. Sette pazienti con SA non assumevano alcuna terapia nel corso del trattamento.

Gli ANA e gli anticorpi anti-dsDNA sono stati determinati con la tecnica dell'immunofluorescenza indiretta (IFI), rispettivamente su cellule HEP-2 e su *Crithidia luciliae*. Tale metodo è servito anche a definire il titolo, il quadro fluoroscopico e la classe immunoglobulinica IgG degli ANA, nonché il titolo e la classe immunoglobulinica IgG degli anti-dsDNA. Sono stati considerati bassi i titoli degli ANA variabili tra 80 e 320, mentre alti quelli \geq 640. Sono stati considerati bassi i titoli del dsDNA variabili tra 20 e 160, mentre alti quelli \geq 320. Gli anticorpi anti-ENA sono stati determinati con una controimmunolettroforesi "in house". Gli ANA, gli anti-dsDNA e gli anti-ENA sono stati valutati prima del trattamento e nei pazienti con AR dopo una media di 41 mesi \pm 11,8 DS, mentre nei pazienti con SA dopo una media di 15,5 mesi \pm 9,9 DS.

Analisi statistica. Il confronto delle frequenze anticorpali fra i diversi gruppi è stato valutato con il test del X^2 , mentre il confronto dei dati appaiati e delle medie è stato eseguito con il test McNemar e l'U-test di Mann-Whitney rispettivamente. Un valore di $p < 0,05$ è stato considerato statisticamente significativo.

RISULTATI

Nel gruppo con AR gli ANA si sono positivamente in 18 dei 22 soggetti negativi prima del trattamento (81,8%). I titoli anticorpali che prima del trattamento erano prevalentemente bassi (20% di bassi titoli *versus* 6,6% di alti titoli), dopo il trattamento sono risultati prevalentemente alti (60% di alti titoli *versus* 26,6% di bassi titoli). Gli ANA basali presentavano una netta prevalenza del quadro fluoroscopico omogeneo, che si è confermata anche negli ANA dopo il trattamento (Tab. I). Il confronto statistico per dati appaiati delle frequenze e il confronto delle medie dei titoli degli ANA prima e dopo trattamento sono risultati significativi ($p=0,001$ e $p=0,01$ rispettivamente). Sempre nei pazienti con AR il confronto delle frequenze degli anticorpi anti-dsDNA prima e dopo trattamento non ha dato risultati significativi; anche il titolo di questi anticorpi che era basso prima si è confermato basso anche dopo la terapia (Tab. II).

Tabella I - Gli ANA basali e dopo trattamento con infliximab nei pazienti con AR e con SA.

ANA	Pazienti con AR				Pazienti con SA			
	Basali		Dopo trattamento		Basali		Dopo trattamento	
	n°	(%)	n°	(%)	n°	(%)	n°	(%)
Frequenza	8	26,6	26	86,6	1	3,3	12	40
Titolo basso (≤ 320)	6	20,0	8	26,6	1	3,3	8	26,6
Titolo alto (≥ 640)	2	6,6	18	60	0	0	4	13
Omogeneo	7	23,3	23	76,6	1	3,3	10	33,3
Nucleolare	1	3,3	2	6,6	0	0	1	3,3
Punteggiato fini grani	0	0	1	3,3	0	0	1	3,3

Tabella II - Gli anti-dsDNA basali e dopo trattamento con infliximab nei pazienti con AR e con SA.

ANA	Pazienti con AR				Pazienti con SA				
	Basali		Dopo trattamento		Basali		Dopo trattamento		
	n°	(%)	n°	(%)	n°	(%)	n°	(%)	
Anti-dsDNA	Frequenza	1	3,3	3	10	0	0	1	3,3
	Titolo basso (≤ 160)	1	3,3	3	10	0	0	0	0
	Titolo alto (≥ 320)	0	0	0	0	0	0	1	3,3

Nella SA si è osservata la positivizzazione degli ANA in 11 dei 29 pazienti negativi prima del trattamento (37,9%). I titoli degli ANA basali erano bassi (100%) e sono rimasti prevalentemente bassi anche dopo trattamento (26,6% di bassi titoli *versus* 13% di alti titoli). Il quadro fluoroscopico omogeneo presente nell'ANA basale si è confermato prevalente negli ANA evidenziati dopo trattamento (Tab. I). Il confronto statistico delle frequenze degli ANA prima e dopo terapia con infliximab è risultato significativo ($p=0,001$); mentre il confronto delle medie dei titoli degli ANA prima e dopo trattamento non era significativo. Gli anticorpi anti-dsDNA nei pazienti con SA erano negativi prima e si sono positivizzati a titolo elevato solo in un paziente dopo la terapia (Tab. II). Il confronto statistico degli anti-dsDNA prima e dopo trattamento è risultato non significativo. Gli anti-ENA erano negativi sia nei pazienti con

AR che in quelli con SA prima della somministrazione d'infliximab e sono rimasti negativi anche dopo il trattamento.

Il confronto dei risultati ottenuti nei pazienti con AR e nei pazienti con SA (Tab. III) ha dimostrato una prevalenza significativa della positivizzazione degli ANA nei soggetti con AR rispetto a quelli con SA ($p=0,004$). Anche la media dei titoli degli ANA positivizzati era significativamente più alta nei pazienti con AR ($p=0,04$), mentre la frequenza e i livelli degli anti-dsDNA positivizzati erano sovrapponibili nelle due malattie.

Nessun paziente affetto da AR o da SA ha sospeso il trattamento con l'infliximab. Nel corso della terapia si sono manifestati effetti collaterali in 4 (13,3%) soggetti con AR e rispettivamente nausea con vomito, febbre, ipogeusia e secchezza cutanea. Nei pazienti affetti da SA sono stati evidenziati effetti collaterali in 2 (6,6%) casi e rispettivamente

Tabella III - Confronto dei risultati autoanticorpali nei pazienti con AR e in quelli con SA.

	Pazienti con AR	Pazienti con SA	Significatività (p)
Positivizzazione ANA	81,8%	37,9%	0,004
Titoli ANA (media \pm DS)	495,3 \pm 231,6	316,6 \pm 256,1	0,04
Positivizzazione anti-dsDNA	6,8%	3,3%	n.s.
Titoli anti-dsDNA	26,6 \pm 11,5	320	-

Tabella IV - Confronto delle medie di VES e PCR nei pazienti con AR e SA positivizzati e rimasti negativi per gli ANA dopo terapia.

		Pazienti con AR		Pazienti con SA	
		positivizzati (significatività) n=18	Rimasti negativi (significatività) n=4	Positivizzati (significatività) n=11	rimasti negativi (significatività) n=18
VES (media±DS)	Basale	52,4±25,3	51,7±31,8	30,9±28,14	26,3±27,5
	Dopo trattamento	*33,2±17,6	18,7±8,6	21,9±21,4	14,8±15,9
PCR (media±DS)	Basale	6,7±10,4	4,8±6,6	4,1±5,6	3,25±3,5
	Dopo trattamento	*0,94±0,9	0,18±0,16	2,1±4,1	1,9±4,6

*Differenza statisticamente significativa (VES: p=0,01; PCR: p=0,02)

ipogeusia con Herpes simplex e afte orali. Quando nei soggetti con AR e in quelli con SA è stata correlata la positivizzazione degli ANA con la comparsa degli effetti collaterali non è emersa alcuna significatività statistica.

L'efficacia del trattamento con infliximab è stata valutata con il monitoraggio dei valori della velocità di eritrosedimentazione (VES) e di quelli della proteina C reattiva (PCR). Sono stati confrontati i valori medi di VES e PCR prima e dopo trattamento, nei pazienti positivizzati per ANA ed in quelli rimasti negativi. I risultati sono illustrati nella tabella IV, dove si può osservare un calo significativo dei valori medi della VES (p=0,01) e della PCR (p=0,02) solo nei pazienti con AR che si sono positivizzati per ANA.

DISCUSSIONE

Gli ANA ed alcuni ANA specifici come gli anti-dsDNA e gli anti-ENA sono stati negli ultimi anni oggetto di molti studi riguardanti gli effetti dell'infliximab. Il nostro lavoro si pone come contributo nella valutazione dell'induzione dei suddetti autoanticorpi in corso di trattamento con questo farmaco biologico in pazienti con AR o SA.

Abbiamo esaminato due gruppi di pazienti affetti rispettivamente da AR e da SA. Essi erano tra loro omogenei per numero; inoltre nell'ambito di ogni gruppo vi era omogeneità per posologia e modalità di somministrazione di infliximab. Gli ANA, gli anti-dsDNA e gli anti-ENA sono stati ricercati con le metodiche attualmente più in uso e comunque ritenute valide sia come sensibilità che come specificità (17). Abbiamo ritenuto opportuno di valutare gli ANA e gli anti-dsDNA soltanto di isotipo IgG, in quanto questo isotipo è considerato di maggiore interesse clinico e di maggio-

re valore patogenetico rispetto agli isotipi IgM e IgA (17). La bassa frequenza di positivizzazione degli anti-dsDNA sia nei pazienti affetti da AR che in quelli affetti da SA potrebbe essere legata alla sola determinazione dell'isotipo IgG; infatti la maggiore positivizzazione degli anti-dsDNA, rilevata da altri autori (14), risulta associata agli isotipi IgM e IgA.

In accordo con la maggior parte degli autori (7, 11, 13) nei pazienti con AR abbiamo osservato un'importante positivizzazione degli ANA (81,8%), che all'analisi statistica è risultata significativa. È stato inoltre osservato in questi soggetti un incremento dei valori medi dei titoli anticorpali dopo trattamento a conferma della notevole capacità di induzione di ANA da parte di infliximab nei pazienti con AR. L'incremento degli ANA e degli anti-dsDNA in accordo con altri studi sembra essere dovuto a meccanismi diversi da quelli che causano effetti collaterali, poiché la loro positivizzazione non è risultata correlata con la comparsa degli effetti avversi nei nostri pazienti. Inoltre è da sottolineare che pur in presenza di un'alta percentuale di positivizzazione di ANA, anche a titolo elevato, non è mai stata osservata in nessun soggetto alcuna manifestazione tipica del LES da farmaci. Per quanto riguarda la relazione tra la positivizzazione degli ANA e l'efficacia del trattamento i nostri risultati mostrano l'assenza di un'influsso negativo, poiché i pazienti positivizzati hanno mostrato dopo trattamento con infliximab un significativo calo dei valori medi di VES e PCR. Tuttavia questo risultato va considerato con cautela in considerazione dello scarso numero dei soggetti esaminati.

Nei pazienti con SA gli ANA sono aumentati significativamente in corso di infliximab e contemporaneamente è aumentato, anche se non in modo significativo, il loro livello. Questi dati conferma-

no la capacità dell'infliximab di indurre ANA anche in pazienti che abitualmente non presentano questi anticorpi come alterazione immunologica presente nella loro malattia. Questa affermazione risulta confermata dalla positivizzazione a titolo elevato anche degli anticorpi anti-dsDNA in un paziente affetto da SA in corso di trattamento.

Gli anticorpi anti-ENA non sono mai stati da noi rilevati nei pazienti con AR o SA e non sono nemmeno comparsi dopo trattamento con infliximab, suggerendo così l'incapacità di questo farmaco di indurre nell'AR e nella SA tali autoanticorpi solitamente specifici delle connettività sistemiche.

Il confronto dei dati ottenuti nei pazienti affetti da AR con quelli dei soggetti con SA è risultato interessante. Infatti ha evidenziato una significativamente maggiore capacità di produrre ANA in cor-

so di infliximab nei pazienti con AR rispetto a quelli con SA. Inoltre l'infliximab nei soggetti con AR ha indotto ANA a titolo significativamente più elevato che nei soggetti con SA. Tali risultati suggeriscono che l'infliximab induce maggiormente gli ANA nei soggetti con AR probabilmente in considerazione della diatesi autoimmune presente in questi pazienti.

Dal punto di vista pratico i nostri risultati suggeriscono che la comparsa degli ANA e degli anti-dsDNA in corso di infliximab non deve essere considerata motivo di sospensione del trattamento nei pazienti con AR o SA. Tuttavia i soggetti che presentano tali positivizzazioni andrebbero più strettamente monitorati sia dal punto di visto clinico che bioumorale con l'obiettivo di comprendere il significato della presenza di questi autoanticorpi.

RIASSUNTO

Abbiamo valutato la frequenza e il significato clinico degli anticorpi antinucleo e degli anti-dsDNA indotti durante terapia con infliximab in pazienti affetti da Artrite Reumatoide (AR) o Spondilite Anchilosante (SA). Sono stati esaminati 30 soggetti affetti da AR e 30 da SA. È stato osservato che il trattamento con infliximab aumenta significativamente la frequenza degli ANA nei pazienti con AR e SA. Tuttavia i soggetti con AR hanno mostrato una maggiore capacità di produrre ANA anche a titolo significativamente più elevato rispetto a quelli con SA. Non è risultata alcuna correlazione tra comparsa di autoanticorpi ed effetti collaterali dell'infliximab.

Parole chiave - Autoanticorpi, artrite reumatoide, spondilite anchilosante, infliximab.

Key words - Autoantibodies, rheumatoid arthritis, ankylosing spondylitis, infliximab.

BIBLIOGRAFIA

- Braun J, Brandt J, Listing J, Zink A, Alten R, Golder W, et al. Treatment of active ankylosing spondylitis with infliximab: a double-blind placebo controlled multicenter trial. *Lancet* 2002; 359: 1187-93.
- Harriman G, Harper LK, Schaible TF. Summary of clinical trials in rheumatoid arthritis using infliximab, an anti-TNF- α treatment. *Ann Rheum Dis* 1999; 58: I61-I64.
- Lipsky PE, van der Heijde DM, St Clair EW, Furst DE, Breedveld FC, Kalden JR, et al. Infliximab and methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis. Anti-Tumor Necrosis Factor Trial in Rheumatoid Arthritis with concomitant Therapy Study Group. *N Engl J Med* 2000; 343: 1594-602.
- van den Bosch F, Kruithof E, Baeten D, Herssens A, De Keyser F, Mielants H, et al. Randomized double-blind comparison of chimeric monoclonal antibody to tumor necrosis factor alpha (infliximab) versus placebo in active spondyloarthritis. *Arthritis Rheum* 2002; 46: 755-65.
- Eriksson C, Engstrand S, Sundqvist KG, Rantapaa-Dahlqvist S. Autoantibody formation in patients with rheumatoid arthritis treated with anti-TNF alpha. *Ann Rheum Dis* 2005; 64: 403-7.
- Choy EH, Panayi GS. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2001; 344: 907-16.
- 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 spondyloarthritis. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 1015-23.
- Lonis M, Rauch J, Armstrong M, Fitzcharles MA. Induction of autoantibodies during prolonged treatment with infliximab. *J Rheumatol* 2003; 30: 2557-62.
- Bobbio-Pallavicini F, Alpini C, Caporali R, Avalle S, Bugatti S, Montecucco C. Autoantibody profile in rheumatoid arthritis during long-term infliximab treatment. *Arthritis Res Ther* 2004; 6: R264-72.
- Caramaschi P, Biasi D, Colombatti M, Pieropan S, Martinelli N, Carletto A, et al. Anti-TNF α therapy in rheumatoid arthritis and autoimmunity. *Rheumatol Int* 2006; 26: 209-14.
- Sellam J, Allanore Y, Batteux F, Deslandre CJ, Weill B, Kahan A. Autoantibody induction in patients with refractory spondyloarthritis treated with infliximab

- and methotrexate. *Joint Bone Spine* 2005; 72: 48-52.
12. Atzeni F, Turiel M, Capsoni F, Doria A, Meroni P, Sarzi-Puttini P. Autoimmunity and Anti-TNF-alpha Agents. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1051: 559-69.
 13. Elkayam O, Burke M, Vardinon N, Zakut V, Yitzhak RB, Paran D, et al. Autoantibodies profile of rheumatoid arthritis patients during treatment with infliximab. *Autoimmunity* 2005; 38: 155-60.
 14. De Rycke L, Baeten D, Kruithof E, Van den Bosch F, Veys EM, De Keyser F. Infliximab, but not etanercept, induces IgM anti-double-stranded DNA autoantibodies as main antinuclear reactivity: biologic and clinical implications in autoimmune arthritis. *Arthritis Rheum.* 2005; 52: 2192-201.
 15. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988; 31: 315-24.
 16. Van der Linden S, Valkenburg HA, Cats A. Evaluation of diagnostic criteria for ankylosing spondylitis. A proposal for modification of the New York criteria. *Arthritis Rheum* 1984; 27: 361-8.
 17. Marcolongo R, Ruffatti A, Morozzi G. Presentazione linee guida del Forum Interdisciplinare per la Ricerca sulle Malattie Autoimmuni (FIRMA). *Reumatismo* 2003; 55: 10-23.