

Titolo progetto: Anticorpi anti-NXP-2 nella dermato-polimiosite: associazione con neoplasia e confronto tra metodiche di laboratorio commerciali con metodiche gold-standard. Studio multicentrico italiano.

Background:

Gli anticorpi anti-NXP-2 (chiamati inizialmente anti-MJ) sono degli autoanticorpi diretti contro la proteina Nuclear Matrix Protein 2, localizzata nei PML nuclear bodies, che fanno parte del gruppo degli anticorpi miosite specifici (MSA). L'antigene MJ è una proteina della matrice nucleare, chiamata NXP2/MORC3, che è coinvolta nella regolazione della senescenza cellulare p53-indotta in risposta a segnali oncogenici.

Nel 1997 sono stati inizialmente descritti nella dermatomiosite giovanile (JDM), una rara patologia nella quale rappresentano l'anticorpo più frequentemente individuato. In questa variante di patologia, configurano un quadro clinico severo e refrattario alla terapia convenzionale, caratterizzato da poliartrite, contratture muscolari, calcinosi e vasculite intestinale.

Successivamente nel 2009 sono stati descritti nella dermatopolimiosite (DM/PM) ad esordio in età adulta (1), più frequentemente nella DM (prevalenza 11-30%). Le manifestazioni cliniche associate sono l'interessamento cutaneo (rash), la calcinosi e gli edemi in sede peri-orbitaria e periferica.

Le DM/PM sono patologie globalmente caratterizzate da una aumentata frequenza di neoplasie rispetto alla popolazione generale. Negli ultimi anni è stata studiata l'associazione di neoplasie con particolari MSA, che è stata confermata per i pazienti con anticorpi anti-TIF1 γ (2), mentre per gli anticorpi anti-NXP-2 sono attualmente disponibili dati discordanti, come riportato nella tabella di seguito.

Autori	anti-NXP-2+ neoplasia+/ neoplasia- (%)	anti-TIF1γ+ neoplasia+/ neoplasia- (%)	MSA+ neoplasia+/ neoplasia- (%)	Totale neoplasia+/ neoplasia- (%)
Ichimura 2012 (3)	4/4 (50)	-	-	-
Ceribelli 2012 (4)	0/10 (0)	-	-	-
Fiorentino 2013 (5)	9/28 (24)	15/67 (18)	5/91 (4)	29/ 186 (13.4)
Ceribelli 2016 (6)	1/2 (33)	3/1 (75)	6/25 (19)	10/28 (26)
Rogers 2017 (7)	5/15 (25)	-	22/136 (14)	27/ 151 (15)
Albayda 2017 (8)	5/51 (9)	-	14/165 (8)	19/216 (8)
Yang 2017 (9)	3/39 (7)	34/55 (38)	21/465 (4)	58 /569 (9)
Totale	27/149 (15)	52/123 (30)	68/ 882 (7)	143/1150 (11)

Da queste pubblicazioni emergerebbe un rischio aumentato di neoplasia rispetto agli altri anticorpi MSA, sebbene inferiore a quello descritto per gli anticorpi anti-TIF1 γ . Tuttavia i limiti di queste pubblicazioni risultano essere:

- Il numero esiguo di casi riportato in ogni studio; in totale sono stati riportati dati in letteratura di 176 casi di pazienti anti-NXP-2 positivi.
- L'eterogeneità nelle metodiche di determinazione degli anti-NXP-2 in diversi studi.

Dal punto di vista laboratoristico, l'attuale metodica gold-standard per la determinazione degli MSA risulta essere l'immunoprecipitazione (IP) di proteine e RNA, confermata poi con test ELISA con proteina NXP-2 ricombinante. Negli ultimi anni sono stati diffusi vari kit commerciali per la determinazione degli MSA e degli anticorpi miosite associati (MAA), che utilizzano metodiche ELISA o di Line Blot (LB) o Dot Blot, permettendone la determinazione anche nei laboratori nei quali non è possibile eseguire di routine l'IP. Questi test hanno dimostrato una buona concordanza con l'IP quando una singola reattività anticorpale è presente. Riguardo alla determinazione dell'anticorpo NXP-2 tuttavia, nella nostra esperienza, abbiamo dimostrato solo una moderata concordanza tra IP e LB (10). Le due principali problematiche che emergevano con l'utilizzo del LB erano la possibilità di falsi positivi (forse dovuta ad una maggiore sensibilità di questa metodica) e la presenza di multiple positività di MSA (presente in 11 su 57 sieri) con una frequenza molto maggiore rispetto a quanto riportato in letteratura, dove vengono descritti come mutualmente esclusivi nella grande maggioranza dei casi (11).

Inoltre, in un precedente studio del nostro centro era stata osservata, in 6 dei 10 pazienti con anticorpi anti-NXP-2, la presenza di un pattern di tipo 'nuclear dots' (dovuto alla presenza dell'antigene NXP-2 nei PML nuclear bodies) (4). In letteratura non vi sono ulteriori dati che consentano di stabilire una correlazione tra positività per anti-NXP-2 ed un preciso pattern degli anticorpi antinucleo in IFI.

Obiettivi dello studio:

- Valutazione del grado di concordanza tra le metodiche per la determinazione degli anticorpi anti-NXP-2 (IP/ELISA ed i test commerciali)
- Valutazione della corrispondenza tra la positività degli anticorpi anti-NXP2 e il pattern di fluorescenza degli anticorpi anti-nucleo (ANA) in IFI
- Analisi delle caratteristiche demografiche e cliniche dei pazienti con positività per anticorpi anti-NXP2, con particolare riferimento alla presenza di calcinosi e di neoplasie, soprattutto quelle sincrone all'esordio della malattia autoimmune. In particolare, verranno poi approfondite le caratteristiche dei pazienti con positività

per anti-NXP2 e neoplasia associata, **inclusa la valutazione del tipo di neoplasia e della relazione temporale tra esordio di neoplasia e miosite**, e possibili subset clinico-demografici.

Metodi dello studio:

Dal punto di vista metodologico il presente progetto prevede:

- La raccolta (entro i prossimi 12 mesi) e l'invio dei sieri di pazienti risultati positivi per anti-NXP-2 con metodica commerciale presso ciascun centro (400 µL). Potranno essere inclusi sia pazienti con nuovo riscontro di tale positività, sia pazienti con pregressa e nota positività (quindi sia pazienti incidenti e prevalenti). Tali sieri verranno quindi testati presso il laboratorio centrale (Humanitas) con duplice metodica IP/ELISA. Verrà quindi confrontato tale risultato con il risultato della metodica commerciale utilizzata presso il centro d'origine.
- Valutazione del pattern di fluorescenza ANA: possibilmente verrà eseguita l'IFI per la determinazione degli ANA (Brescia). In ogni caso viene richiesto nel database allegato anche di indicare il pattern ANA che è stato determinato presso il centro di provenienza.
- I sieri sopra indicati dovranno quindi essere inviati presso il centro di Brescia all'indirizzo: UO Reumatologia ed Immunologia Clinica, ASST Spedali Civili di Brescia, Piazzale Spedali Civili 1, 25123 Brescia. Vi richiederemmo inoltre di prendere contatto, onde stabilire i dettagli della spedizione, inviando una e-mail ai seguenti indirizzi: franco.franceschini1@gmail.com (Prof. Franco Franceschini), ilariacava@virgilio.it (Dr.ssa Ilaria Cavazzana), mariagrazialazzaroni@gmail.com (Dr.ssa Maria Grazia Lazzaroni), fredi.micaela@gmail.com (Dr.ssa Micaela Fredi).
- I centri partecipanti invieranno, contestualmente ai sieri, una e-mail a antonella.radice@asst-santipaolocarlo.it per segnalare alla segreteria la propria partecipazione (indicare n° campioni)
- Per i sieri di pazienti per i quali è possibile risalire anche alle informazioni cliniche, verrà chiesto di compilare il database in allegato, con focus particolare su calcinosi e neoplasie, in particolare le neoplasie sincrone con l'esordio di malattia. Per quanto riguarda l'associazione con neoplasie sincrone (intese come diagnosticate in un intervallo di tempo di più o meno 2 anni dall'inizio della patologia autoimmune) verranno considerati nell'analisi dei dati, solo quei pazienti con almeno 2 anni di follow up clinico.

Bibliografia:

- 1) Betteridge Z, Gunawardena H, Chinoy H, et al. Autoantibodies to the p140 Autoantigen NXP-2 in Adult Dermatomyositis. *Arthritis Rheum* 2009. 60; S304.
- 2) Wang, J., Guo, G., Chen, G., et al. Meta-analysis of the association of dermatomyositis and polymyositis with cancer. *Br J Dermatol* 2013. 169: 838-847.
- 3) Ichimura Y, Matsushita T, Hamaguchi Y, et al. Anti-NXP2 autoantibodies in adult patients with idiopathic inflammatory myopathies: possible association with malignancy. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2012. 71(5):710-3.
- 4) Ceribelli A, Fredi M, Taraborelli M, et al. Anti-MJ/NXP-2 autoantibody specificity in a cohort of adult Italian patients with polymyositis/ dermatomyositis. *Arthritis Research & Therapy* 2012. 14:R97
- 5) Fiorentino, DF, Chung LS, Christopher-Stine L, et al. Most patients with cancer-associated dermatomyositis have antibodies to Nuclear Matrix Protein NXP-2 or Transcription Intermediary Factor 1 γ . *Arthritis & Rheumatism* 2013. 65: 2954-2962.
- 6) Ceribelli A, Isailovic ., De Santis M, et al. Myositis-specific autoantibodies and their association with malignancy in Italian patients with polymyositis and dermatomyositis. *Clin Rheumatol* 2017. 36: 469.
- 7) Rogers A, Chung L, Li S, et al. Cutaneous and Systemic Findings Associated With Nuclear Matrix Protein 2 Antibodies in adult dermatomyositis patients. *Arthritis Care Res* 2017. 69: 1909-1914.

- 8) Albayda J, Pinal-Fernandez I, Huang W, et al. Dermatomyositis patients with Anti-Nuclear Matrix Protein-2 Autoantibodies have more edema, more severe muscle disease, and increased malignancy risk. *Arthritis care & research* 2017. 69(11):1771-1776
- 9) Yang H, Peng Q, Yin L, et al. Identification of multiple cancer-associated myositis-specific autoantibodies in idiopathic inflammatory myopathies: a large longitudinal cohort study. *Arthritis research & therapy* 2017. 19(1), 259.
- 10) Cavazzana I, Fredi M, Ceribelli A, et al. Testing for myositis specific autoantibodies: comparison between line blot and immunoprecipitation assays in 57 myositis sera. *Journal of immunological methods* 2016. 433, 1-5.
- 11) Lega, J. C., Fabien, N., Reynaud, Q, et al. The clinical phenotype associated with myositis-specific and associated autoantibodies: a meta-analysis revisiting the so-called antisynthetase syndrome. *Autoimmunity reviews* 2014. 13(9), 883-891.