

## LAVORO ORIGINALE

# Significato clinico dei quadri fluoroscopici specifici per il fuso mitotico in pazienti affetti da malattie reumatiche\*

## *Clinical significance of fluoroscopic patterns specific for the mitotic spindle in patients with rheumatic diseases*

P. Grypiotis, A. Ruffatti, M. Tonello, C. Winzler, C. Radu, S. Zampieri, M. Favaro, A. Calligaro, S. Todesco

*Cattedra e Divisione di Reumatologia, Università degli Studi di Padova*

### SUMMARY

**Objective:** we proposed to determine the clinical significance of anti-NuMA and anti-HsEg5 antibodies in a group of patients affected with rheumatic diseases.

**Materials and methods:** indirect immunofluorescence on HEp-2000 cells at serum dilution of 1:40 was used to examine 26 sera which had previously showed a "mitotic spindle" fluoroscopic pattern type during laboratory routine.

**Results:** 21 sera (80,7%) were identified with NuMA and 5 (19,3%) with HsEg5 patterns alone or associated with other ANA patterns. However only patients with isolated positiveness and that is 15 with NuMA and 4 with HsEg5 stainings were included in this study. Of the NuMA positive patients 5 were affected with arthropathies associated to different forms of thyroiditis, 2 with seronegative arthritis, 2 with antiphospholipid syndrome, 1 with systemic lupus erythematosus (SLE), 1 with rheumatoid arthritis, 1 with sicca syndrome, 1 with undifferentiated connective tissue disease, 1 with *Mycoplasma pneumoniae* infection and 1 with retinal thrombosis. Of the HsEg5 positive patients 3 were affected with SLE and 1 with seronegative arthritis.

**Conclusions:** NuMA does not prevail in any defined rheumatic disease, while HsEg5 staining were more frequent (75%) in patients affected with SLE all of whom showing high antibody titres.

Reumatismo, 2002; 54(3):232-237

### INTRODUZIONE

Gli anticorpi antinucleo (ANA) costituiscono un folto gruppo di anticorpi specifici per antigeni "self" contenuti nei nuclei cellulari. Si tratta quindi di autoanticorpi non organo specifici che possono essere presenti in numerose condizioni morbide. Tuttavia nelle malattie reumatiche essi raggiungono le maggiori frequenze e mostrano ben definite caratteristiche. Tra le metodiche di determinazione degli ANA la più comune è l'immunofluorescenza indiretta (IFI). Con essa gli ANA ven-

gono distinti sulla base del quadro fluoroscopico e del titolo anticorpale. Il substrato antigenico attualmente più usato è rappresentato dalle cellule HEp-2, una linea cellulare continua proveniente da adenocarcinoma laringeo umano. Possono essere così distinti sei principali patterns fluoroscopici: omogeneo, granulia diffusa, nucleolare, centromerico, punteggiato fini grani e punteggiato grossi grani (1). Con minore frequenza si possono osservare anche altri patterns di fluorescenza nucleare tra cui ricordiamo quelli caratterizzati dalla colorazione delle proteine del fuso mitotico.

Il fuso mitotico è un complesso di microtubuli originato dai centrosomi; esso media la separazione dei cromosomi durante la mitosi (2, 3). I centrosomi comprendono una coppia di centrioli microtubulari circondati da una nuvola amorfa. Il fuso comprende 3 tipi di microtubuli: "microtubuli del

\*Lavoro premiato al XXXVIII Congresso SIR di Padova, 2001

Indirizzo per la corrispondenza:

Dott. Panagiotis Grypiotis, Cattedra e Divisione di Reumatologia  
Università degli Studi di Padova, Via Giustiniani 2, 35128 Padova  
E-mail: panagiotis.grypiotis@unipd.it

**Tabella I** - Patterns fluoroscopici degli anticorpi anti-NuMA e anti-HsEg5 durante il ciclo cellulare.

Fasi del ciclo cellulare	NuMA	HsEg5
Interfase	Fini granulazioni	Negativa
Profase	Colorazione brillante dei centrosomi	Colorazione diffusa dei centrosomi
Metafase	Intensa fluorescenza della regione pericentrosomiale	Intensa fluorescenza che si estende da polo a polo
Anafase	Come in metafase	Come in metafase
Telofase	Negativa	Positività del ponte intercellulare

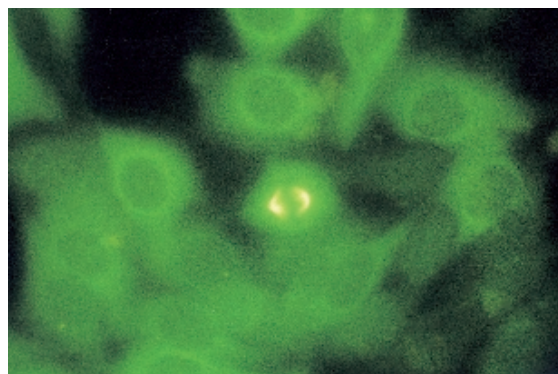
cinetochore”, i quali si attaccano nei cromosomi al complesso centromero/cinetochore, “microtubuli polari”, che si interdigitano con quelli dei poli opposti ed i “microtubuli a forma di stella” o “asters”, che comprendono microtubuli liberi citoplasmatici. Ogni microtubulo è composto da tubulina e da proteine denominate Proteine Associate ai Microtubuli (MAPs). Autoanticorpi contro la tubulina sono rari e sono stati correlati a malattie croniche del fegato e a malattie infettive (4). La maggior parte dei sieri che reagisce con il fuso mitotico riconosce due principali proteine: NuMA ed HsEg5 (5, 6).

Il NuMA (Nuclear Mitotic Apparatus) è una proteina di ~250 kDa distribuita nella regione pericentrosomiale dei due poli durante la mitosi. È stato dimostrato che questa proteina è importante durante la fase terminale della separazione cromosomica e nel riassetto nucleare. Il NuMA risiede nei nuclei anche durante l'interfase e risponde a segnali esterni come ad esempio diversi ormoni induttori di divisione cellulare (7).

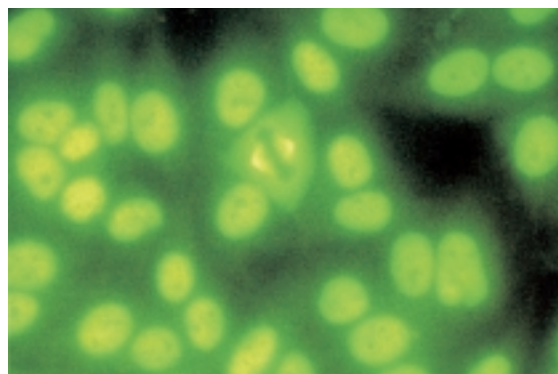
L'HsEg5 è una proteina di ~115 kDa appartenente alla famiglia BimC delle proteine Kinesin-like (8). Questa proteina è essenziale per la separazione dei centrosomi durante la profase ma non è essenziale per la loro formazione iniziale. L'HsEg5 mostra una complessa distribuzione durante la mitosi e si trova associato con i centrosomi, i microtubuli del fuso e le specifiche regioni del ponte intercellulare (9).

Con l'uso dell'IFI è possibile distinguere facilmente questi due anticorpi a causa della diversa disposizione dei loro antigeni durante il ciclo cellulare (Tab. I). Infatti durante l'interfase il NuMA si trova nei nuclei, colorandoli a fini granulazioni, mentre l'HsEg5 non è distinguibile. Nella profase l'HsEg5 si trova nella regione di ciascun centrosoma, mentre il NuMA è presente nel nucleoplasma e circonda i cromosomi. Successivamente con la

rottura della membrana nucleare, sia l'HsEg5 sia il NuMA si trovano nella regione centrosomiale. In metafase però si possono distinguere due diversi patterns fluoroscopici: HsEg5 produce un'intensa colorazione che si estende dalla regione centrosomiale lungo i microtubuli del cinetocore (Fig. 1),



**Figura 1** - IFI su cellule HEp-2000. Anticorpo anti-HsEg5. È visibile la colorazione intensa da polo a polo nelle cellule in metafase e l'assenza di fluorescenza nucleare nelle cellule in interfase. (1000X)



**Figura 2** - IFI su cellule HEp-2000. Anticorpo anti-NuMA. È visibile la colorazione brillante della regione pericentrosomiale nelle cellule in metafase e la colorazione dei nuclei delle cellule in interfase. (1000X)

mentre NuMA reagisce con i microtubuli del fuso solo nella regione pericentrosomiale producendo un pattern ad U a livello dei poli (Fig. 2). L'HsEg5 continua a mostrare un'associazione con i microtubuli durante l'anafase e appare anche in associazione con i microtubuli polari durante la formazione del ponte intercellulare. NuMA durante questo periodo sembra confinato nella regione pericentrosomiale. In tarda telofase l'HsEg5 si trova a livello del ponte intercellulare, mentre il NuMA non è più distinguibile durante questo periodo. Gli anticorpi anti-fuso mitotico sono riportati in una vasta gamma di malattie, senza però un significato clinico ben definito (5, 6, 10, 11). Scopo di questo studio è di valutare l'associazione clinica degli anticorpi anti-NuMA ed anti-HsEg5 in un gruppo di pazienti affluiti presso il Reparto e gli ambulatori della Cattedra e Divisione di Reumatologia dell'Università di Padova e risultati positivi per tali anticorpi.

## MATERIALI E METODI

Sono stati testati con la tecnica dell'IFI 26 sieri che avevano presentato un quadro fluoroscopico tipo "fuso mitotico" nel corso della routine esplorata tra Gennaio 1991 e Luglio 2001 dal nostro laboratorio.

Sono state usate come substrato antigenico cellule HEP-2000, fornite dalla ditta Immuno Concepts (Sacramento, U.S.A.). I sieri in esame venivano opportunamente diluiti a 1:40 con una soluzione di tampone fosfato (PBS) a pH 7,4. La reazione antigene anticorpo richiedeva 30 min. a temperatura ambiente, in una camera umida chiusa. Il siero veniva allontanato prima con un lavaggio rapi-

do e poi con due lavaggi da 10 minuti ciascuno. Successivamente si ricopriva il substrato antigenico con immunosiero fluorosceinato anti-IgG umane (Immuno Concepts) per 30 min. Si effettuavano poi tre lavaggi, come indicato sopra, in tampone PBS.

Per la lettura veniva usato un microscopio a fluorescenza Leitz Orthoplan ad illuminazione incidente ultravioletta. I sieri risultati positivi sono stati titolati con il sistema delle diluizioni scalari ed il titolo anticorpale è stato espresso come basso (40-80), medio (160-320) e alto ( $\geq 640$ ). La lettura è stata eseguita da due esaminatori indipendenti e sono stati considerati positivi i sieri dove vi era concordanza.

Per valutare la presenza di altri quadri fluoroscopici o altri autoanticorpi associati tutti i sieri in esame sono stati testati con l'IFI su cellule HEP-2000 con l'IFI su *Crithidia luciliae* per gli anticorpi anti DNA nativo e con la controimmuno-elettroforesi per gli anti-ENA di tipo SSA, SSB, Sm, U1-RNP, Topoisomerasi-I, PM-1, Jo-1, PCNA, SL, Ku.

## RISULTATI

L'anticorpo anti-NuMA è stato identificato in 21 (80,7%) sieri, mentre l'anti-HsEg5 in 5 (19,3%). In 15/21 sieri la positività per l'anti-NuMA era isolata, mentre in 6/21 era associata a quella di altri anticorpi (Tabella II); l'anticorpo anti-HsEg5 era presente da solo in 4/5 sieri, invece era associato in 1/5 (Tab. II).

Sono stati presi in considerazione nel nostro studio soltanto i pazienti con positività isolata o per l'anti-NuMA o per l'anti-HsEg5.

I 15 sieri positivi per anti-NuMA presentavano un

**Tabella II** - Associazione degli anti-NuMA ed anti-HsEg5 con altri anticorpi.

Siero	NuMA	HsEg5	Altri quadri fluoroscopici	Anti-ENA		
				SSA	SSB	SL
1	+	-	Centromerico	-	-	-
2	+	-	Omogeneo	-	-	-
3	+	-	-	SSA	SSB	-
4	+	-	-	SSA	-	-
5	+	-	-	SSA	-	SL
6	+	-	Omogeneo	-	-	-
7	-	+	-	SSA	SSB	-

**Tabella III** - Dati clinici dei pazienti positivi per l'anti-NuMA.

Diagnosi	Positività n.	Titolo anticorpale		
		Alto	Medio	Basso
Artropatie associate a vari tipi di tiroidite	5	4	1	-
Artrite sieronegativa	2	1	-	1
Sindrome da antifosfolipidi	2	-	2	-
Lupus eritematoso sistemico	1	1	-	-
Artrite reumatoide	1	-	-	1
Sindrome secca	1	-	1	-
Connettivite indifferenziata	1	1	-	-
Infezione da Mycoplasma	1	-	-	1
Trombosi retinica	1	-	-	1

titolo anticorpale alto in 7 casi, medio in 4 e basso in 4. I 4 sieri positivi per anti-HsEg5 presentavano un titolo anticorpale alto in 3 casi e basso in uno.

I 15 pazienti che presentavano il quadro fluoroscopico NuMA erano 2 (13,3%) uomini e 13 (86,7%) donne con età media di  $48,85 \pm 4,04$  DS. Essi erano rispettivamente affetti: 5 (33,33%) da artropatie associate a vari tipi di tiroidite, 2 (13,33%) da artriti sieronegative, 2 (13,33%) da sindrome da anticorpi antifosfolipidi, 1 (6,66%) da lupus eritematoso sistemico (LES), 1 (6,66%) da artrite reumatoide (AR), 1 (6,66%) da sindrome secca, 1 (6,66%) da connettivite indifferenziata, 1 (6,66%) da infezione da Mycoplasma e 1 (6,66%) da trombosi retinica.

Il titolo anticorpale era alto in 4 (57,14%) pazienti con artropatie associate a tiroidite, in 1 (14,28%) con artrite sieronegativa, in 1 (14,28%) con LES ed 1 (14,28%) con connettivite indifferenziata. Il titolo era medio in 2 (50%) pazienti con sindrome da anticorpi antifosfolipidi, 1 (25%) con sindrome sic-

ca ed in 1 (25%) con artropatia associata a tiroidite. Il titolo era basso in 1 (25%) paziente con artrite reumatoide, in 1 (25%) con artrite sieronegativa, in 1 (25%) con trombosi retinica ed in 1 (25%) con infezione da Mycoplasma (Tab. III).

I 4 pazienti che presentavano il pattern HsEg5 erano tutte donne con età media di  $59,25 \pm 5,12$  DS. Ed erano affette rispettivamente 3 (75%) da LES ed 1 (25%) da artrite sieronegativa.

Il titolo anticorpale era alto in tutte e 3 le pazienti con LES, mentre era basso in quella con artrite sieronegativa (Tab. IV).

## DISCUSSIONE

L'apparato mitotico è composto da molte strutture che interagiscono fra loro come i cromosomi, i microtubuli del fuso, i centrosomi e il ponte intercellulare. Ognuna di queste strutture contiene delle proteine che possono diventare autoantigeni nelle malattie autoimmuni. In generale queste proteine

**Tabella IV** - Dati clinici dei pazienti positivi per l'anti-HsEg5.

Diagnosi	Positività n.	Titolo anticorpale		
		Alto	Medio	Basso
Lupus eritematoso sistemico	3	3	-	-
Artrite sieronegativa	1	-	-	1

sono di 2 categorie: quelle che vengono identificate esclusivamente durante la mitosi e quelle che sono presenti durante tutto il ciclo cellulare. La distinzione dei due quadri fluoroscopici degli anticorpi anti-NuMA e anti-HsEg5 nelle malattie autoimmuni viene fatta in base alla loro distribuzione durante tutto il ciclo cellulare. Infatti gli anti-NuMA possono essere visti anche durante l'interfase, mentre gli anti-HsEg5 nel corso della mitosi. La diversa distribuzione dell'HsEg5 e del NuMA, durante il ciclo cellulare, permette la distinzione di queste due proteine basandoci al loro pattern fluoroscopico (6).

Gli anticorpi anti-NuMA sono stati identificati in diverse patologie (5, 6, 11) senza comunque aver acquisito un ben definito significato clinico. Soltanto nello studio effettuato da Andrade e coll. (5) veniva riportata la prevalenza della sindrome di Sjögren (SS) nel 53% dei pazienti positivi per anti-NuMA. Tuttavia tale associazione clinica risulta criticabile perché ben 4/9 pazienti erano positivi anche per anti-SSA ed anti-SSB e di conseguenza la SS poteva essere legata più a questi anticorpi che all'anti-NuMA. Nella nostra casistica l'anti-NuMA viene considerato come anticorpo isolato e non risulta associato a nessuna patologia ben definita, perché le 15 positività erano legate a ben 9 diverse diagnosi cliniche. Risulta comunque interessante l'associazione dell'anti-NuMA alle artropatie da tiroidite (5/15), perché presenta la maggiore prevalenza e nella gran parte dei casi (4/5) si tratta di positività anticorpale a titolo elevato. Tale dato potrebbe essere in accordo con lo studio di Limaye e coll. (10) nel quale gli anticorpi anti-MSA (mitotic spindle apparatus), compresi anche gli anti-NuMA, vengono correlati soprattutto ne-

gli alti titoli con gli anticorpi anti-tiroide.

L'anti-HsEg5, per quando riguarda l'associazione clinica, è stato oggetto in letteratura in due studi (5, 6) dove vengono ottenuti risultati diversi. Infatti mentre nel primo (5) non viene rilevata alcuna associazione clinica ben definita, nel secondo (6) viene correlato al LES. Vi è d'aggiungere che il primo lavoro (5) non riporta se l'anti-HsEg5 sia da solo o associato ad altri anticorpi, diminuendo così l'attendibilità della correlazione clinica. Nella nostra esperienza l'anti-HsEg5 è stato considerato solo quando presente da solo ed è risultato associato in 3 su 4 casi alla diagnosi di LES. È da notare che tutti e tre i pazienti presentavano un alto livello anticorpale. La quarta positività era associata ad artrite sieronegativa e presentava un basso livello anticorpale.

I nostri risultati confermano i dati della letteratura che attribuiscono una frequenza maggiore all'anti-NuMA rispetto all'anti-HsEg5. Tuttavia nonostante la maggiore frequenza l'anti-NuMA non è risultato associato ad alcuna malattia. Pertanto il suo significato clinico rimane dubbio e soltanto la sua maggiore prevalenza nelle tiroiditi ci induce in accordo con altri autori (10) ad approfondire in maniera mirata questo aspetto ricercandoli nei pazienti portatori di autoimmunità tiroidea.

L'anti-HsEg5 pur risultando più raro ha mostrato una netta prevalenza nel LES, soprattutto quando era presente a titolo elevato. Questo dato in accordo con un altro lavoro (6) ci induce ad approfondire il significato della presenza dell'anti-HsEg5 nel LES ed in particolare a definire le caratteristiche cliniche di pazienti lupici positivi per tale anticorpo.

## RIASSUNTO

*Scopo del lavoro:* ci siamo proposti di valutare il significato clinico della presenza degli anticorpi anti-NuMA ed anti-HsEg5 in un gruppo di pazienti affetti da malattie reumatiche.

*Materiali e metodi:* con l'uso dell'immunofluorescenza indiretta su cellule HEp-2000 e alla diluizione sierica di 1:40 abbiamo ritestato 26 sieri che presentavano un pattern fluoroscopico tipo "fuso mitotico" nel corso della routine del nostro laboratorio. Risultati: sono stati identificati 21 (80,7%) sieri con il pattern NuMA e 5 (19,3%) con il quadro fluoroscopico HsEg5. Le correlazioni tra anticorpi e aspetti clinici sono state eseguite soltanto nei pazienti con positività isolata.

*Conclusioni:* il quadro fluoroscopico HsEg5, pur avendo una frequenza più bassa del NuMA, è risultato associato, quando presente a titolo elevato, esclusivamente al LES, mentre il NuMA non è prevalso in nessuna malattia.

**Parole chiave** - Immunofluorescenza indiretta, fuso mitotico, NuMA, HsEg5.

**Key words** - Indirect immunofluorescence, mitotic spindle, NuMA, HsEg5.

**BIBLIOGRAFIA**

1. Tan EM. Autoantibodies in nuclear antigens (ANA): their immunobiology and medicine. *Adv Immunol* 1982; 33: 167-240.
2. Hyman AA, Karsenti E. Morphogenetic properties of microtubules and mitotic spindle assembly. *Cell* 1996; 84: 401-10.
3. Compton DA. Spindle assembly in animal cells. *Annu Rev Biochem* 2000; 69: 95-114.
4. Castell M. Autoantibodies. In: Peter JB & Shoenfeld Y, editors. Elsevier Science BV Amsterdam: 1996: 217-22.
5. Andrade LEC, Chan EKL, Peebles CL, Tan EM. Two major autoantigen-antibody systems of the mitotic spindle apparatus. *Arthritis Rheum* 1996; 39: 1643-53.
6. Whitehead CM, Winkfein RJ, Fritzler MJ, Rattner JB. The spindle kinesin-like protein HsEg5 is an autoantigen in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1996; 39: 1635-42.
7. Zeng C. NuMA: a nuclear protein involved in mitotic centrosome function. *Microsc Res Tech* 2000; 49: 467-77.
8. Blangy A, Lane HA, Herin P, Harper M, Kress M, Nigg EA. Phosphorylation by p34<sup>cdc2</sup> regulates spindle association of human Eg5, a kinesin-related motor protein essential for bipolar spindle formation in vivo. *Cell* 1995; 83: 1159-69.
9. Whitehead CM, Rattner JB. Expanding the role of HsEg5 within the mitotic and post-mitotic phases of the cell cycle. *J Cell Sci* 1998; 111: 2551-61.
10. Limaye V, Gillis D, Roberts-Thomson P, Pile K. The clinical associations of mitotic spindle autoantibodies in a South Australian cohort. *Aust N Z J Med* 1999; 29: 713-7.
11. Auer-Grumbach P, Achleitner B. Epidemiology and clinical associations of NuMA (Nuclear Mitotic Apparatus Protein). *J Rheumatol* 1994; 21: 1779-81.