

ANTICUERPOS ANTINUCLEARES COMO BIOMARCADORES DE EXCLUSIÓN
PARA ENFERMEDADES AUTOINMUNES SISTÉMICAS REUMÁTICAS: ANTI-
DFS70/LEDGFp75 Y SU IMPORTANCIA CLÍNICA

PAOLA PATRICIA GUZMAN NAZMIN

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
PROGRAMA DE BIOLOGIA
SAN JUAN DE PASTO
2016

ANTICUERPOS ANTINUCLEARES COMO BIOMARCADORES DE EXCLUSIÓN
PARA ENFERMEDADES AUTOINMUNES SISTÉMICAS REUMÁTICAS: ANTI-
DFS70/LEDGFp75 Y SU IMPORTANCIA CLÍNICA

PAOLA PATRICIA GUZMAN NAZMIN

ENSAYO FINAL DE TRABAJO DE GRADO MODALIDAD DIPLOMADO
DIPLOMADO EN INMUNOLOGIA BASICA Y SU APLICACIÓN CLINICA
UNIVERSIDAD EL BOSQUE

ASESORA

MONICA LILIANA GUERRERO MEJIA
Bacterióloga

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS
PROGRAMA DE BIOLOGIA
SAN JUAN DE PASTO
2016

NOTA DE RESPONSABILIDAD

Las ideas y conclusiones aportadas en el siguiente trabajo de grado son responsabilidad exclusiva del autor. Artículo 1° del Acuerdo No. 324 de Octubre 11 de 1966 emanado del Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.

NOTA DE ACEPTACIÓN

MONICA LILIANA GUERRERO MEJIA
Directora

MARIA CONSUELO ROMERO SANCHEZ
Jurado

San Juan de Pasto, Diciembre 1 del 2016

ANTICUERPOS ANTINUCLEARES COMO BIOMARCADORES DE EXCLUSIÓN PARA ENFERMEDADES AUTOINMUNES SISTÉMICAS REUMÁTICAS: ANTI-DFS70/LEDGFp75 Y SU IMPORTANCIA CLÍNICA

Paola Patricia Guzmán

*Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas,
Universidad de Nariño*

RESUMEN. Anti-DFS70/LEDGFp75 es un anticuerpo antinuclear (ANA) dirigido al autoantígeno conocido como factor de crecimiento derivado del epitelio lenticular LEDGFp75, comúnmente observado en el laboratorio por IFI en células HEp-2 como patrón granular fino denso (DFS-IIF). Aunque el anti-DFS70 está relacionado con diversos padecimientos inflamatorios como cistitis intersticial, dermatitis atópica y cáncer estableciendo posible asociación con patogenicidad, su baja frecuencia en pacientes con enfermedad reumática autoinmune y su elevada prevalencia en pacientes aparentemente sanos hacen que se considere como un importante potencial biomarcador diferencial y de exclusión de ERA en las pruebas ANA-positivas. El conocimiento de la biología de autoantígeno y autoanticuerpo abre el camino para plantear interrogantes que a través de la investigación permitan definir cuál es el papel que juega el anti-DFS70 en procesos autoinmunes asociados y no asociados a ERA y entender los mecanismos de patogenicidad que hay detrás de este nuevo biomarcador. La presente revisión tiene como objetivo dar a conocer las características biológicas del anti-DFS70, los métodos para su detección y su importancia clínica en ERA.

INTRODUCCION

Los anticuerpos antinucleares (ANAs) son inmunoglobulinas que se producen como respuesta ante antígenos propios, es decir, que reaccionan contra elementos celulares del propio organismo. La presencia de ANAs representa el

sello serológico de una amplia gama de trastornos, incluyendo las enfermedades autoinmunes sistémicas reumáticas (ERA), donde la presencia de altos títulos de autoanticuerpos IgG en suero que son utilizados como marcadores moleculares contribuyendo de manera significativa al diagnóstico y tratamiento de este tipo patologías que hasta el momento no tienen cura y de las cuales sus mecanismos de patogenicidad no están claramente definidos, convirtiéndose en un reto tanto en la clínica como en el laboratorio debido al impacto que tienen en la calidad de vida de los pacientes. ¹⁻⁴.

La Inmunofluorescencia indirecta (IFI) en sustrato de células HEp-2 (cultivo de células neoplásicas Human Epidermoid carcinoma "strain" 2), desde que fue descrita por primera vez en 1958 por George Friou y hasta la actualidad, continua siendo el gold standard para la detección de ANAs y una valiosa herramienta en el reconocimiento de ERA ⁵⁻⁶. A pesar de la alta sensibilidad de esta prueba, su falta de especificidad representa una desventaja al momento de realizar un diagnóstico preciso de ERA, puesto que aún en pequeñas cantidades los ANAs en este sustrato pueden generar resultados positivos, sin que esto implique que estén asociados al desarrollo de patología. Se estima que un porcentaje considerable de los resultados positivos obtenidos por IFI en HEp-2, aproximadamente el 20%, puede obtenerse en muestras de suero de individuos sanos ⁶. Diferentes estudios apuntan a que estos "falsos positivos" en las muestras de pacientes aparentemente sanos están asociados a un patrón en Inmunofluorescencia indirecta que fue descubierto en la década de los noventa conocido como Granular Fino Denso óDFS-IIF (Dense Fine Speckled). De ese 20% de positividad en individuos sanos un 50% corresponde a DFS-IIF ^{2-3,7-9}.

El patrón DFS-IIF corresponde a autoanticuerpos dirigidos contra el antígeno DFS-70, también conocido como LEDGFp75 (lensepithelium-derived growth factor), una proteína de 70-75 kDa asociada con la supervivencia celular, la respuesta contra el estrés celular que cumple un papel fundamental en la integración del VIH-1 a los

cromosomas celulares^{6,10}. Aunque el anti-DFS70/LEDGFp75 no es nuevo para la ciencia, el interés en él ha cobrado fuerza debido a su relativamente común ocurrencia en pacientes ANA positivos que no presentan evidencia de ERA, los cuales exhiben altos títulos en suero del anticuerpo en contraposición con la pobre incidencia encontrada en pacientes con diagnóstico ERA. Distintas investigaciones que han obtenido resultados similares postulan el uso del anti-DFS70/LEDGFp75 como un biomarcador útil para excluir pacientes con ERA, aunque no descartan su asociación con otro tipo de patologías, puesto que aunque algunos lo consideran como un autoanticuerpo natural también se ha observado que puede ser patogénico en determinados contextos^{6,11-14}.

Estudios recientes demuestran que incluso con el paso de los años, hasta 4 años o más, los pacientes anti-DFS70 positivos no desarrollan ninguna sintomatología que los asocie con ERA, lo cual hace de anti-DFS70 un marcador confiable incluso a largo plazo¹⁵.

El nivel de evidencia que se ha ido produciendo en los últimos años muestra el gran impacto que la detección de anti-DFS70 puede tener, no solo para el diagnóstico y adecuado tratamiento del paciente, sino para contribuir al mejoramiento de la atención médica disminuyendo la sobresaturación del sistema de salud al evitar que la obtención de un ANA positivo resulte en una consulta terciaria innecesaria. Las proyecciones derivadas de varias investigaciones indican una disminución notable en los costos que se generan anualmente debido a referencias inadecuadas a especialistas terciarios al descartar a través del marcador de exclusión la necesidad de remisión al reumatólogo por el riesgo de padecer de ERA. Sin embargo, más allá de la reducción en los costos lo verdaderamente importante a considerar es que con el uso de anti-DFS70 se mejora la calidad de la atención médica reduciendo la ansiedad en pacientes al tiempo que se previene una terapia innecesaria y potencialmente tóxica^{3,15-16}.

En la presente revisión se consideran algunos de los aspectos biológicos y técnicos más relevantes del anti-DFS70, así como su aplicación e importancia clínica a la vez que se plantean algunos interrogantes que a través de futuras investigaciones permitan mejorar nuestro entendimiento sobre este autoanticuerpo y ratificarlo como un importante marcador diferencial para ERA.

HISTORIA DEL ANTI-DFS70/LEDGFp75

Los primeros acercamientos al anti-DFS70/LEDGFp75 surgieron en la década de los noventa cuando Ochs y colaboradores en 1994 identificaron a través de ensayos en sustrato de células Hep-2 humanas y en tejido de riñón tejido estomacal de ratón un fuerte patrón de IFI en el suero pacientes con cistitis que denominaron DFS-IIF o Moteado Fino Denso, el cual no había sido descrito en enfermedades autoinmunes sistémicas y que correspondía a autoanticuerpos exclusivamente IgG¹⁷. Ochs posteriormente identificó mediante la técnica de Western blot una proteína de 70 kD a la cual eran dirigidos los autoanticuerpos que definían el patrón DFS-IIF y utilizando un alto título de anticuerpos anti-DFS70, aisló y secuenció de manera parcial el cDNA para DFS70 y lo depositó en GenBank. Este cDNA fue usado para expresar una proteína recombinante con la que determinó la prevalencia de anticuerpos en algunas enfermedades, encontrando asociación entre los anticuerpos contra DFS70 y el 30% de los pacientes con dermatitis atópica, el 16% de los pacientes con asma y el 9% de los pacientes con cistitis intersticial ⁸.

Posteriormente la secuenciación de DFS70 fue completada e ingresada nuevamente a GenBank. Gracias a esto se comprobó que la secuencia del autoantígeno DFS70 era exactamente igual a un gen recién descubierto, el co-activador de transcripción p75 que junto con su variante más corta de empalme fueron identificados como co-activadores de transcripción del complejo de la ARN polimerasa II ^{8,11,18}.

Tras la observación de un factor de crecimiento en las células epiteliales de pacientes con cataratas cuya presencia era capaz de favorecer el crecimiento y supervivencia celular y que en ausencia desataba la muerte celular programada o "apoptosis" un grupo de investigadores aislaron clones de una biblioteca de cDNA que codificaban una proteína en las células epiteliales de la lente humana con un anticuerpo extraído de un paciente de catarata. La proteína fue denominada como LEDGF o factor de crecimiento derivado del epitelio lenticular. Este ensayo concluyó con la neutralización de LEDGF por parte del anticuerpo lo cual bloqueó el crecimiento celular y causó la muerte celular indicando que LEDGF es un posible factor regulador que puede desempeñar un papel importante para el crecimiento y la supervivencia celular de una amplia gama de tipos de células¹⁹. Estudios similares a este continuaron definiendo a este co-activador de transcripción, ahora conocido como LEDGFp75, como un factor de crecimiento en las células epiteliales lenticulares (LEC). No obstante, en la actualidad los estudios demuestran que el papel de LEDGFp75 va más allá de un factor de crecimiento que está más estrechamente relacionado con la protección o respuesta frente al estrés^{11,20,21}. Estudios demostraron que durante los eventos de apoptosis LEDGFp75 es clivada por caspasas perdiendo esa capacidad de dar respuesta en condiciones de estrés al igual que su función pro la supervivencia. Los ensayos *in vitro* han proporcionado evidencia de que los fragmentos del clivaje de LEDGFp75 son reconocidos por autoanticuerpos. Asimismo, este clivaje apoptótico y escisión de LEDGFp75 puede estar contribuyendo a la patogénesis de trastornos por la alteración de sus funciones de supervivencia aumentando su inmunogenicidad²².

Una década después del descubrimiento inicial de LEDGFp75 cuatro investigaciones independientes dirigieron el interés a un nuevo descubrimiento sobre LEDGFp75 relacionado con su papel en la infección por VIH. En estas investigaciones se dio a conocer el papel fundamental que cumple la proteína en

la integración del VIH-1 en la cromatina del huésped, dilucidando los diferentes aspectos de la formación del complejo integrasa VIH1/LEDGFp75²³⁻²⁶.

En los últimos años múltiples estudios se han realizado con relación a la prevalencia de anticuerpos anti-DFS70/LEDGFp75 en pacientes sanos y también para establecer su incidencia en enfermedades reumáticas autoinmunes ERA^{2,3,7,8,13,15}. A partir del año 2004 se empezaron a encontrar observaciones iniciales que mostraban la baja prevalencia de anti-DFS70/LEDGFp75 en individuos aparentemente sanos⁷. Watanabe y colaboradores analizaron muestras en suero de 597 individuos y reportaron que un porcentaje considerable (20%) de individuos sanos son ANA positivos por IFI, de los cuales el 50% se atribuye a la reactividad a DFS70, donde el patrón DFS-IIF se traduce en un resultado positivo de ANA por IFI aunque no tiene relación conocida con ERA⁷. En 2005 Dellavance y colaboradores obtuvieron un 16,5% de individuos que mostraron el patrón granular fino denso DFS-IIF de una cohorte de 30.728 muestras. El seguimiento de los individuos anti-DFS70 positivos donde el desenlace clínico fue seguido de cerca, no presentó condiciones de ERA, pero sí condiciones no específicas como dolor difuso y otros resultados que incluyeron neoplasias, enfermedades infecciosas y tiroiditis²⁷.

Las siguientes investigaciones describen a anti-DFS70/LEDGFp75 como un potencial biomarcador de exclusión para ERA. En 2011 Mariz analizó a 918 individuos sanos y 153 individuo diagnosticados con ERA obteniendo que un 12,9% de los individuos sanos reportaron positividad para anti-DFS70, patrón que no se encontró en ningún paciente diagnosticado con ERA⁵. Al hacer el seguimiento de los pacientes anti-DFS70 positivos por un periodo de 3 a 5 años se apreció que no desarrollaron ninguna sintomatología o manifestación clínica asociada a ERA demostrando su efectividad en lapsos prolongados de tiempo¹⁵. Otros estudios apoyan el uso del anti-DFS70/LEDGFp75 como marcador de exclusión para ERA, sin embargo, plantean la necesidad de realizar pruebas

confirmatorias de fase sólida tales como pruebas de ELISA o quimioluminiscenciapara corroborar que la reactividad mostrada por el patrón de IFI corresponda efectivamente a anti-DFS70/LEDGFp75^{9,14}.

Los más recientes estudios no solo resaltan el potencial que representa la utilización de anti-DFS70/LEDGFp75 como marcador diferencial de ERA sino que se enfocan también en las ventajas económicas que representa para los sistemas de salud al reducir notablemente las remisiones innecesarias a especialistas y la disminución en la aplicación de tratamientos agresivos en pacientes donde la positividad no implica asociación a ERA, tratamiento que podrían representar un riesgo para la salud del paciente^{3,27}.

CARACTERISTICAS DEL AUTOANTIGENO DFS70/LEDGFp75

LEDGFp75 es una proteína multifuncional asociada a la cromatina condensada del núcleo que corresponde a una isoforma de la proteína LEDGF o factor de crecimiento derivado del epitelio lenticular. Esta proteína de 530 aminoácidos de longitud cumple con diversas funcionesdentro de la célula tales como señalización de la apoptosis, supervivencia al estrés, co-activador en la transcripción, participa en la inflamación al estar implicado en la activación de la vía de IL-6 /STAT3, en procesos de transformación maligna y también juega un papel importante en la integración del VIH-1 a la cromatina del huésped²⁹.

Tanto LEDGFp75 como su variante de empalme más corta llamada p52 están codificadas por PSIP1, ungen adyacente al principal locus de malignidad celular asignado al cromosoma 9p22.2. El gen PSIP1 está formado por 15 exones y 14 intrones. DFS70/LEDGFp75 se codifica con los exones 1-15, y los exones 1–9 y una pequeña parte del intrón 9 (24 nucleótidos) codifican a p52^{28,29}. Aunque otras variantes de empalme de este gen han sido identificadas, DFS70/LEDGFp75 and p52 son las más comunes¹¹.

DFS70/LEDGFp75 cuenta con dominios bien definidos. Su región N-terminal está comprendida por elementos de unión a la cromatina tales como un dominio PWWP (Fig. 1C), definido por un motivo formado por prolina-triptófano-triptófano-prolina, regiones cargadas positivamente (CR), motivos AT-hook y una señal de localización nuclear (NLS). Todas estas secuencias facilitan la unión de DFS70/LEDGFp75 a sitios de transcripción activos en la cromatina, donde interactúa con los complejos de transcripción de la ARN polimerasa-II para regular la expresión génica frente al estrés²⁹.

La región C-terminal de DFS70/LEDGFp75 está conformada por un dominio altamente conservado que contiene el epítipo que es reconocido por los autoanticuerpos (residuos 349-435). Las funciones de actividad transcripcional, actividad de supervivencia al estrés y servir como centro de las interacciones proteína-proteína se le atribuyen a este dominio llamado IBD. Curiosamente, este dominio que es el principal determinante de autoinmunidad de DFS70/LEDGFp75 es también el sitio de interacción con la integrasa del VIH-1. Esta interacción favorece la integración del cDNA vírico en regiones transcripcionalmente activas del genoma. Los ensayos por western blotting e inmunoprecipitación realizados para evaluar estas interacciones con las dos isoformas de la proteína demostraron que solamente la isoforma p75 es capaz de realizar esta interacción. La falta de precipitación de p52 en las muestras confirmó que la interacción se da exclusivamente con el dominio IBD, que se encuentra ausente en la variante de empalme corta p52^{11,23,29}.

El dominio IBD también muestra una homología significativa con HRP-2, una proteína miembro de la familia las HDGF (factores de crecimiento derivados del hepatoma), que también puede interactuar con la integrasa del VIH³⁰.

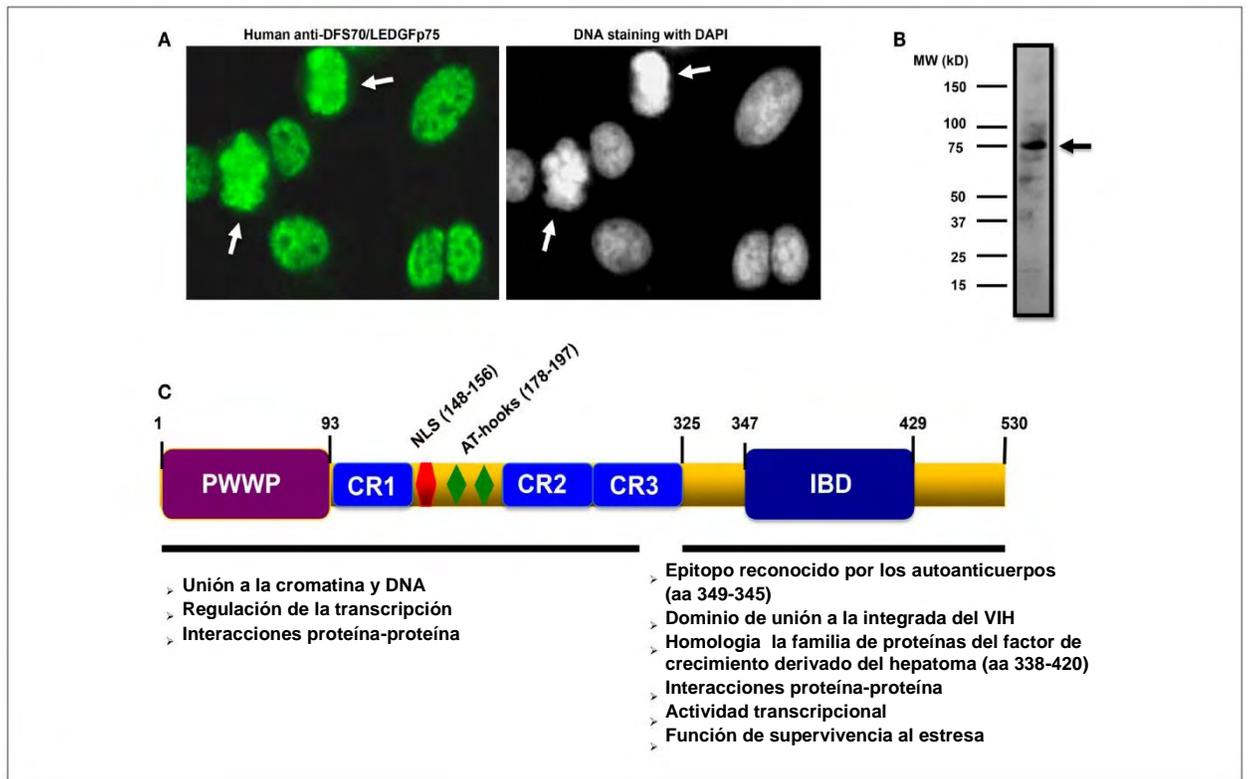


Figura 1. Características de DFS70/LEDGFp75 y sus autoanticuerpos.(A) Patrón de tinción de anti-DFS70/LEDGFp75 humanos en HEp-2 visualizadas por microscopia de Inmunofluorescencia indirecta (IFI). Las flechas apuntan a la tinción brillante en los cromosomas de la metafase condensada. (B) Inmunoblot mostrando reactividad al suero que contiene autoanticuerpos anti-DFS70/LEDGFp75 frente a lisados proteicos totales de células de cáncer de próstata PC3. Se observó una banda prominente de aproximadamente 75 kDa con el suero. La inmunoreactividad se detectó mediante quimioluminiscencia mejorada. (C) Diagrama que representa los principales dominios estructurales y motivos de DFS70/LEDGFp75 con sus funciones propuestas (Basu et al, 2015.)

Como lo plantean Ochs y otros investigadores, la importancia biológica de estos hallazgos coincidentes no está actualmente clara y aún se carece de la información suficiente para entender la verdadera magnitud de las funciones celulares intrínsecas que tiene el dominio IBD y en general el DFS-70/LEDGFp75^{2,11}. Lo cierto es que estos descubrimientos plantean más preguntas que respuestas, como qué hace que el autoanticuerpo este dirigido exactamente contra la misma región de interacción de DFS-70/LEDGFp75 con la integrasa del VIH-1, está anti-DFS70/LEDGFp75 relacionado con la respuesta a infecciones

virales como las ocasionadas por VIH? Pueden estos autoanticuerpos ser utilizados en un futuro como opción terapéutica contra VIH? Estos interrogantes pueden ser el comienzo de investigaciones que amplíen la utilidad clínica de anti-DFS70 y que mejoren el entendimiento de este autoanticuerpo y su antígeno.

GENERALIDADES DE ANTI-DFS70/LEDGFp75

Los anti-DFS70/LEDGFp75 son autoanticuerpos predominantemente de isotipo IgG que comúnmente exhiben altos títulos en individuos sanos o con diversas enfermedades inflamatorias¹¹. Estos anticuerpos están dirigidos a un antígeno que corresponde a una proteína de 70–75 kD conocida como factor de crecimiento derivado del epitelio lenticular o LEDGFp75 y pueden ser detectados y observados a través de microscopia por Inmunofluorescencia indirecta en células HEp-2 como patrón moteado fino denso o granular fino denso^{3,8-9,11}. Estos anticuerpos se observan con muy poca frecuencia en pacientes con ERA en combinación con otros autoanticuerpos marcadores de enfermedades sistémicas autoinmunes como anti-DNA, anti-p80 coilin, y anti-topo I y casi nunca se observan de modo solitario en estos pacientes^{11,14}.

Aunque no es clara la relación que existe entre el anti-DFS70/LEDGFp75 y los alelos específicos de HLA, también se ha observado que en pacientes con anti-DFS70/LEDGFp75 se evidencia un incremento en las frecuencias de los alelos (HLA)-DRB1, (HLA)-DQB1, y (HLA)-DPB1, a pesar de que una fuerte correlación entre estos podría no estar establecida¹⁴.

DETECCION DEL ANTI-DFS70/LEDGFp75 DENTRO DE LOS ANAs

Desde su descripción y hasta la actualidad, la Inmunofluorescencia indirecta en sustrato de células HEp-2 continúa siendo la prueba por excelencia para la detección de ANAs. El fundamento de esta técnica es relativamente sencillo, los

anticuerpos anti-nucleares (ANAs) de la muestra de suero se unen a sus correspondientes antígenos presentes en el sustrato celular poliantigénico que corresponde a las células HEP-2. Una vez unidos y tras varios lavados para eliminar los anticuerpos no unidos al sustrato, los anticuerpos se ponen de manifiesto mediante la incubación con un antisuero formado por anticuerpos contra las inmunoglobulinas humanas denominado conjugado con fluoresceína y se visualizan por microscopía de fluorescencia³¹. Esta prueba semicuantitativa permite evaluar al microscopio los patrones nucleares de fluorescencia observados asociándolos con diferentes patologías, donde cada padecimiento asociado a ANAs exhibe uno o varios patrones característicos y donde se puede hacer una aproximación cuantitativa al tener la posibilidad de realizar títulos y medir la reactividad y la expresión de patrones en esos diferentes títulos^{1,31-33}.

Como un autoanticuerpo perteneciente al grupo de los ANAs, anti-DFS70/LEDGFp75 puede ser identificado a través del patrón característico en la prueba de IFI en HEP-2, este patrón se identifica con el nombre de Moteado Fino Denso o Granular Fino Denso y con las siglas DFS-IIF (Figura 2). El patrón Granular Fino Denso recibe su nombre de la imagen característica obtenida por IFI donde se distingue un patrón granular distribuido por todo el núcleo de las células en interfase (Figura 2a), donde a lo largo del núcleo en interfase se pueden observar zonas más densas y más débiles de los gránulos (Figura 2b), lo cual es un rasgo muy característico, al igual que su placa metafásica con un fuerte patrón granular donde se destacan algunas manchas gruesas (Figura 2c)^{32,34}.

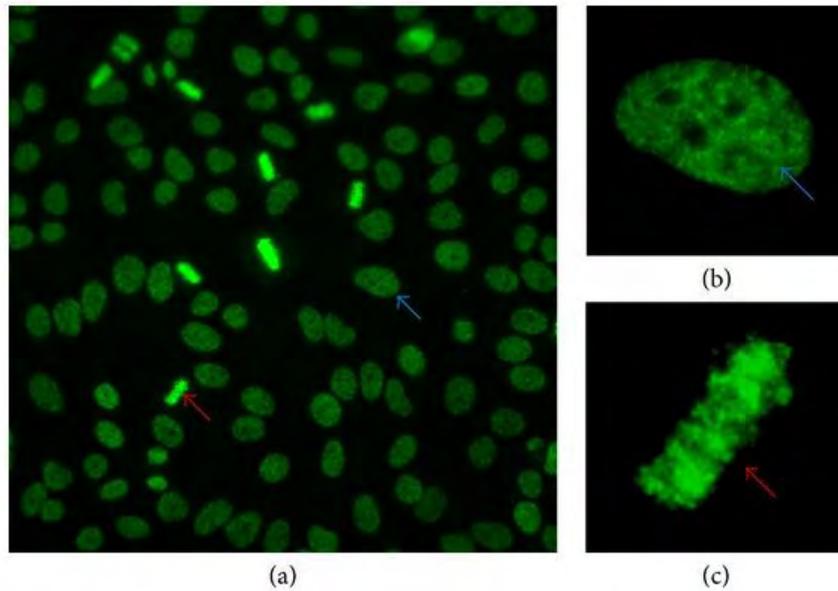


Figura 2. Patrón característico de tinción de anticuerpos anti-DFS70. El patrón de tinción moteado fino denso (DFS) característico de células HEp-2 en interfase está indicado por la flecha azul y la tinción fuerte de cromatina de células mitóticas por la flecha roja. **(a)** Vista de campo amplia usando una ampliación de 40x, **(b)** patrón fino denso de un núcleo de interfase, y **(c)** de la cromatina de metafase de una célula mitótica. (Mahler et al, 2014)

Pese a su gran utilidad y difusión por ser el goldstandard de las pruebas para ANAs, la técnica de Inmunofluorescenciaindirecta en HEp-2 presenta algunas restricciones. Si bien esta técnica presenta una gran sensibilidad está limitada por su baja especificidad. Adicionalmente, al depender del microscopio se convierte en una técnica muy subjetiva que depende de la interpretación de la imagen por parte personal técnico y que requiere de un alto nivel de experiencia para que la lectura sea precisa y brinde un resultado de calidad^{1,31,35-36}.

Algunos estudios mencionan el reto que representa la lectura del patrón granular fino denso por IFI en HEp-2 incluso para los lectores expertos, demostrando que en la identificación de anti-DFS70/LEDGFp75 los patrones de Inmunofluorescencia son sólo orientativos y no aportan la identificación definitiva

del anticuerpo. Esto plantea una fuerte necesidad de realizar ensayos de confirmación para verificar la reactividad a DFS70³⁶.

Partiendo de lo anterior, una vez comprobada la presencia del patrón DFS-IIF se debe confirmar la identidad del autoanticuerpo y corroborar su especificidad para reaccionar con DFS70/LEDGFp75. Con este fin se utiliza una de las pruebas ENA que son técnicas de detección más sensibles y específicas de fase sólida basadas en la reacción antígeno-anticuerpo, tales como ELISA, inmunoblotting, quimioluminiscencia, Inmunofluorescencia con inmunoabsorción, hemoaglutinación entre otras, siendo las dos primeras las más utilizadas en la actualidad dentro del laboratorio^{31,35}.

Inmunoblotting es la técnica más utilizada para el estudio de la especificidad de los ANA en la que el antígeno utilizado es una suspensión de proteínas celulares obtenidas mediante la solubilización de las membranas celulares. Mediante electroforesis se separan las proteínas según su peso molecular y se transfieren a una membrana de nitrocelulosa, que se enfrentará con el suero del paciente. Mediante esta técnica el resultado positivo para anti-DFS70/LEDGFp75 se podrá observar como una banda de aproximadamente 75 kD (Figura 1b)¹. Por otra parte, ELISA es un método inmunométrico más rápido y eficaz que utiliza antígenos que han sido obtenidos mediante purificación celular o síntesis *in vitro* de la proteína recombinante³⁵.

PATOLOGIAS NO-ERA ASOCIADAS AL ANTI-DFS70/LEDGFp75

La presencia de los autoanticuerpos anti-DFS70/LEDGFp75 ha sido reportada y asociada a diversos padecimientos clínicos por varios grupos de investigadores durante el transcurso de las últimas dos décadas, especialmente en enfermedades inflamatorias no asociadas a enfermedad autoinmune sistémica que van desde la

cistitis intersticial, dermatitis atópica, cataratas, hasta condiciones más severas como el cáncer^{8,11,28,37}.

Cistitis Intersticial, dermatitis atópica y asma. Inicialmente el patrón de anti-DFS70/LEDGFp75 fue identificado por Ochs y su grupo de investigación en un paciente con cistitis intersticial, una condición de la vejiga caracterizada por la infiltración predominante de células mononucleares de la lámina propia con linfocitos, células plasmáticas y mastocitos. Años más tarde el mismo investigador asocio a este autoanticuerpo con otras condiciones inflamatorias, especialmente con la dermatitis atópica, un trastorno crónico que frecuentemente es identificado en la infancia y que avanza hacia el asma y la rinitis alérgica en la edad adulta. En esta ocasión, Ochs reportó que el sistema autoanticuerpo-autoantígeno se encontraba en el 30% de los pacientes con dermatitis atópica, y en un porcentaje un poco menor en pacientes con asma y cistitis intersticial^{8,37}.

Cáncer. Frente al cáncer, un estudio en diferentes tipos de tumores en 2012 informó una frecuencia significativamente mayor de autoanticuerpos anti-DFS70/LEDGFp75 en pacientes con cáncer de próstata comparados con controles de diferentes edades y géneros³⁸. Sin embargo, esto no se aplica a otros tipos de cáncer donde al comparar las frecuencias de anti-DFS70/LEDGFp75 con los controles no se muestran diferencias significativas. Por otra parte, estudios recientes muestran una sobreexpresión del autoantígeno DFS70/LEDGFp75 a nivel transcripcional y de proteínas que está por encima del doble del valor que alcanza en tejidos no malignos^{28,38}. Este aumento en el nivel de las proteínas podría ser el resultado del microambiente en el tejido afectado gracias al aumento de la inflamación y el estrés oxidativo lo cual promueve la proliferación celular, supervivencia al estrés y resistencia a la muerte celular inducida indicando que existe una relación entre el autoantígeno DFS70/LEDGFp75, el tumor emergente y la oncoproteína que es relevante en múltiples tipos de cáncer²⁸.

Oftalmopatías. Los anticuerpos anti-DFS70/LEDGFp75 han sido reportados en diversas oftalmopatías, en algunas de las cuales se le adjudica un papel patogénico debido a su capacidad de inducir citotoxicidad en las células del epitelio lenticular LEC y absorber extracelularmente al autoantígeno DFS70/LEDGF provocando que no pueda desempeñarse como factor de supervivencia en las LEC³⁹. El papel patogénico de anti-DFS70/LEDGFp75 también se ha evidenciado en muestras de suero que presentan un patrón DFS-IIF en células HEp-2 donde se puede apreciar una fuerte reacción contra las fibras reticulares de los lentes y el epitelio corneal⁴⁰. Dentro de este tipo de padecimientos fue reportado uno de los porcentajes de incidencia de anti-DFS70/LEDGFp75 más altos con un 67% de positividad en pacientes confirmados para enfermedad de Vogt-Koyanagi-Harada (VKH), un desorden inflamatorio que afecta múltiples órganos que contienen melanocitos¹¹.

Trombofilia. En 2015 Martel y colaboradores dieron a conocer por primera vez un estado pro-coagulante inmune que involucra a los autoanticuerpos anti-DFS70/LEDGFp75. En su análisis reveló una prevalencia de la enfermedad trombótica en pacientes con anticuerpos anti-DFS70 que alcanzó 13,1%, un porcentaje considerable en comparación con el 3% obtenido en pacientes sanos. De igual forma, al analizar el tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT) de los pacientes con historial de trombosis y anti-DFS70/LEDGFp75 positivo se encontró que fue mucho menor que la relación de aPTT de pacientes negativos para autoanticuerpo. Estas observaciones sugieren que los pacientes trombóticos con anticuerpos anti-DFS70 pueden tener un estado de hipercoagulabilidad⁴¹.

ANTI-DFS70/LEDGFp75 Y ENFERMEDAD REUMATICA AUTOINMUNE SISTEMICA

Las ERAS son un grupo de enfermedades caracterizadas por la inflamación crónica de las articulaciones y de otros tejidos del cuerpo. Dentro de los padecimientos más importantes y mejor estudiados entre las ERAS tenemos a la artritis reumatoide (AR), el lupus eritematoso sistémico (LES), la espondilitis anquilosante (EA) y la artritis psoriásica (AP). Las ERAS se caracterizan por la formación de autoanticuerpos que pueden detectarse por diversos métodos y cuya identificación es muy importante para su diagnóstico y adecuado tratamiento⁴². Como parte de ese adecuado diagnóstico tenemos la identificación de anti-DFS70/LEDGF.

Las evidencias mostradas por diferentes estudios indican que la presencia de autoanticuerpos anti-DFS70/LEDGFp75 es rara en ERAS¹³. Las frecuencias registradas oscilan entre el 0% y el 2,8%^{7,8,13} en pacientes diagnosticados que contrastan con su alta prevalencia en individuos sanos que van desde un 11% hasta un 20%, en títulos que pueden alcanzar 1:5120 en ciertos individuos^{7,28}.

A pesar de que las razones que subyacen a la prevalencia relativamente baja de autoanticuerpos anti-DFS70/LEDGFp75 observada en pacientes con ERA no son claras, este autoanticuerpo representa un biomarcador potencialmente importante para discriminar ERA de individuos sanos ANA-positivos o que padecen otras afecciones inflamatorias tales como dermatitis atópica, cistitis intersticial o incluso cáncer^{3,13}.

CONCLUSIONES

La presencia de anti-DFS70/LEDGFp75 en el suero del paciente representa un importante indicio de NO asociación a enfermedad sistémica reumática

autoinmune convirtiéndolo en un biomarcador de exclusión fiable en este tipo de padecimientos. La importancia clínica de anti-DFS70/LEDGFp75 en el diagnóstico y tratamiento del paciente con sospecha de ERA así como en el mejoramiento del acceso a la atención clínica y la reducción en los costos derivados del mal análisis de un falso ANA-positivo junto con el impacto negativo en la salud del paciente por tratamientos inadecuados se ha considerado a través de las numerosas investigaciones que al respecto se han realizado en las últimas dos décadas. Sin embargo, los estudios de anti-DFS70/LEDGFp75 han estado principalmente dirigidos a poblaciones caucásicas y asiáticas y no existe la suficiente evidencia del comportamiento del autoanticuerpo en nuestras poblaciones, donde el nivel de mestizaje es mucho mayor y puede afectar radicalmente los resultados. Con base en lo anterior, se plantea la necesidad de evaluar la asociación anti-DFS70/LEDGFp75 y ERA en poblaciones mestizas como la nuestra para confirmar la viabilidad de la utilización de este autoanticuerpo como marcador de exclusión en nuestro contexto.

Por otra parte, aprovechar al máximo el potencial de anti-DFS70 como marcador diferencial en ERA depende de la correcta evaluación e interpretación de los resultados en el proceso inicial de enfoque del paciente, la cual requiere no solo del manejo experto de las técnicas sino también el adecuado conocimiento de los aspectos más relevantes de la biología del anti-DFS70 y su auto antígeno. No todos los laboratorios de diagnóstico clínico están familiarizados con el patrón de anti-DFS70/LEDGFp75, el cual en la mayoría de los casos es reportado solo como un patrón mixto de IFI o solamente como ANA-positivo, de allí la importancia de la difusión del manejo a nivel de laboratorio y del clínico. En el caso de anti-DFS70/LEDGFp75 la prueba de IFI en HEp-2 debe considerarse como una herramienta de diagnóstico inicial que necesita de confirmación. Ante un resultado positivo por IFI la prueba confirmatoria de fase sólida es de vital importancia para descartar que el resultado no se derive de patrones superpuestos o mixtos que realmente no correspondan a antiDFS70/LEDGFp75.

Aún se desconocen muchos aspectos de la biología de la proteína DFS70/LEDGFp75 que necesitan ser estudiados para tener una mejor comprensión del contexto en el que surgen los autoanticuerpos anti-DFS70/LEDGFp75. Con esto, la utilidad clínica de anti-DFS70/LEDGFp75 puede alcanzar nuevas dimensiones que pueden ir más allá del diagnóstico diferencial de ERA y convertirse incluso en una opción terapéutica ante infecciones virales tan importantes como el VIH.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Robles MA, RamosCM. Significado clínico de los anticuerpos antinucleares. JANO. [Internet]. Sep 2005. [citado 2016 Nov 17];(1578):85-90. Disponible en:
<http://www.jano.es/ficheros/sumarios/1/0/1578/85/1v0n1578a13079664pdf001.pdf>
2. Casiano CA, Ganapathy V. Autoimmunity to the Nuclear Autoantigen DFS70 (LEDGF): What Exactly Are the Autoantibodies Trying To Tell Us?. *Arthritis & Rheum.* 2004;50(3):684-688.
3. Gundin S, Irure VJ, Asensio E, Ramos D, Mahler M, López HM, et al. Measurement of anti-DFS70 antibodies in patients with ANA-associated autoimmune rheumatic diseases suspicion is cost-effective. *AutoimmunHighlights.*[Internet]. 2016. [Citado 2016 Nov 17];7(1):10. Disponible en:<http://doi.org/10.1007/s13317-016-0082-1>
4. Tan EM. Autoantibodies and autoimmunity: a three-decade perspective. A tribute to Henry G. Kunkel. *Ann NY Acad Sci.* 1997;815:1–14.
5. Iglesias GA. Historia del Lupus y Síndrome Antifosfolipídico. 1ª ed. Bogotá: Panamericana Editores; 2003.
6. Leroux MB, Svetaz MJ. Anti DFS70 ¿Un auto anticuerpo marcador de salud?: Revisión. *Rev. argent. dermatol.* [Internet]. 2016 Mar [citado 2016 Nov 21]; 97(1):25-29. Disponible en:http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1851-300X2016000100003&lng=es.
7. Watanabe A, Kodera M, Sugiura K, Usuda T, Tan EM, Takasaki Y, et al. . Anti-DFS70 Antibodies in 597 Healthy Hospital Workers. *Arthritis & Rheumatism.* 2004;50(3):892-900.
8. Ochs RL, Muro Y, Si Y, Ge H, Chan EK, Tan EM. Autoantibodies to DFS 70 kd/transcription coactivator p75 in atopic dermatitis and other conditions. *J AllergyClinImmunol.* 2000;105:1211–1220.

9. Satoh M, Chan EK, Ho LA, Rose KM, Parks CG, Cohn RD, et al. Prevalence and sociodemographic correlates of antinuclear antibodies in the United States. *Arthritis Rheum.* 2012;64(7):2319-2327.
10. Sanchez TW, Debnath B, Christ F, Otake H, Debyser Z, Neamati N. Discovery of novel inhibitors of LEDGF/p75-IN protein–protein interactions. *BioorgMedChem.* 2013;21(4):957-963.
11. Ochs RL, Mahler M, Basu A, Rios CL, Sanchez TW, Andrade LE, et al. The significance of autoantibodies to DFS70/LEDGFp75 in health and disease: integrating basic science with clinical understanding. *ClinExpMed.* 2016;16(3):273–293.
12. Sener AG, Afşar İ. Frequency of dense fine speckled pattern in immunofluorescence screening test. *Eur J Rheumatol.* 2015;2(3):103-105.
13. Mahler M, Parker T, Peebles CL, Andrade LE, Swart A, Carbone Y, et al. Anti-DFS70/LEDGF Antibodies Are More Prevalent in Healthy Individuals Compared to Patients with Systemic Autoimmune Rheumatic Diseases. *J Rheumatol.* 2012;39(11):2104-2110.
14. 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;40:92-93.
15. Mariz HA, Sato EI, Barbosa SH, Rodrigues SH, Dellavance A, Andrade LE. 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&Rheumatism.* 2011;63(1):191-200.
16. Narain S, Richards HB, Satoh M, Sarmiento M, Davidson R, Shuster J, et al. Diagnostic accuracy for lupus and other systemic autoimmune diseases in the community setting. *Arch Intern Med.* 2004;164(22):2435-2441.
17. Ochs RL, Stein TW, Peebles CL, Gittes RF, Tan EM. Autoantibodies in interstitial cystitis. *J Urol.* 1994;151(3):587–592.

18. Ge H, Si Y, Roeder RG. Isolation of cDNAs encoding novel transcription coactivators p52 and p75 reveals an alternate regulatory mechanism of transcriptional activation. *EMBO J.* 1998;17:6723–6729.
19. Singh DP, Ohguro N, Kikuchi T, Sueno T, Reddy VN, Yuge K, et al. Lens epithelium-derived growth factor: effects on growth and survival of lens epithelial cells, keratinocytes, and fibroblasts. *BiochemBiophys Res Commun.* 2000;267(1):373-381.
20. Shinohara T, Singh DP, Chylack LT. Review: age-related cataract—immunity and lens epithelium-derived growth factor (LEDGF). *J OculPharmacolTher.* 2000;16:181–191.
21. Singh DP, Ohguro N, Chylack LT Jr, Shinohara T. Lens epithelium-derived growth factor: increased resistance to thermal and oxidative stresses. *InvestOphthalmol Vis Sci.* 1999;40:1444–1451.
22. Wu X, Daniels T, Molinaro C, Lilly MB, Casiano CA. Caspase cleavage of the nuclear autoantigen LEDGF/p75 abrogates its pro-survival function: implications for autoimmunity in atopic disorders. *Cell Death Differ.* 2002;9:915–25.
23. Cherepanov P, Maertens G, Proost P, Devreese B, Van Beeumen J, Engelborghs Y, et al. HIV-1 integrase forms stable tetramers and associates with LEDGF/p75 protein in human cells. *J Biol Chem.* 2003;278(1):372-381.
24. Maertens G, Cherepanov P, Pluymers W, Busschots K, De Clercq E, Debyser Z, et al. LEDGF/p75 is essential for nuclear and chromosomal targeting of HIV-1 integrase in human cells. *J Biol Chem.* 2003;278(35):33528-39.
25. Maertens G, Cherepanov P, Debyser Z, Engelborghs Y, Engelman A. Identification and characterization of a functional nuclear localization signal in the HIV-1 integraseinteractor LEDGF/p75. *J BiolChem.* 2004;279(32):33421-9.
26. Llano M, Vanegas M, Fregoso O, Saenz D, Chung S, Peretz M, Poeschla EM. LEDGF/p75 determines cellular trafficking of diverse lentiviral but not

- murine oncoretroviral integrase proteins and is a component of functional lentiviral preintegration complexes. *J Virol.* 2004;78(17):9524-37.
27. Fitch-Rogalsky C, Steber W, Mahler M, Lupton T, Martin L, Barr SG, et al. Clinical and serological features of patients referred through a rheumatology triage system because of positive antinuclear antibodies. *Plos.* [Internet]. 2014 [citado 2016 Nov 21];97(1):25-29. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3976309/pdf/pone.0093812.pdf>
 28. Basu A, Sanchez TW, Casiano CA. DFS70/LEDGFp75: an enigmatic autoantigen at the interface between autoimmunity, AIDS, and cancer. *Front Immunol.* [Internet]. Mar 2015 [Citado 2016 Nov 21] ;6:116. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2015.00116>
 29. Singh DP, Kimura A, Chylack LT Jr, Shinohara T. Lens epithelium-derived growth factor (LEDGF/p75) and p52 are derived from a single gene by alternative splicing. *Gene.* 2000;242:265–273.
 30. Dietz F, Franken S, Yoshida K, Nakamura H, Kappler J, Gieselmann V. The family of hepatoma-growth factor proteins: characterization of a new member HRP-4 and classification of its subfamilies. *Biochem J.* 2002;366:491–500.
 31. Cabiedes J, Nuñez AC. Anticuerpos antinucleares. *Reumatol Clin.* 2010;6(4):224–230.
 32. Mahler M, Meroni PL, Bossuyt X, Fritzler MJ. Current concepts and future directions for the assessment of autoantibodies to cellular antigens referred to as anti-nuclear antibodies. *J Immunol Res.* [Internet]. 2014 [Citado 2016 Nov 21];2014:315179. Disponible en: <https://www.hindawi.com/journals/jir/2014/315179/>
 33. Buchner C, Bryant C, Eslami A, Lakos G. Anti-Nuclear Antibody Screening Using HEP-2 Cells. *J. Vis. Exp.* [Internet]. 2014 [Citado 2016 Nov 21];88:1-8. Disponible en: <http://www.jove.com/video/51211/anti-nuclear-antibody-screening-using-hep-2-cells>

34. International Consensus in Ana Patterns ICAP [homepage en Internet]. USA: Universidade Federal de São Paulo, University of Florida; c2016[actualizada 25 octubre 2016; consultado 21 noviembre 2016]. Disponible en: <http://www.anapatterns.org/>
35. Carballo OG, Ingénito FB, Ginaca AA, Carabajal P, Costa MA, Balbaryski J. Primer Consenso Argentino para la Estandarización de la Determinación de Anticuerpos Anti-Nucleares por Inmunofluorescencia Indirecta–HEp-2. *Acta BioquímClínLatinoam.* 2012;46(1):3-13.
36. Bizzaro N, Tonutti E, Villalta D. 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 et al. *Arthritis Rheum.* 2011;63(12):4036-4037.
37. Mahler M, Fritzler MJ. The clinical significance of the dense fine speckled immunofluorescence pattern on HEP-2 cells for the diagnosis of systemic autoimmune diseases. *ClinDevImmunol* . [Internet]. 2015 [Citado 2016 Nov 21];2012:494356. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1155/2012/494356>.
38. Basu A, Rojas H, Banerjee H, Cabrera IB, Perez KY, et al. (2012) Expression of the Stress Response Oncoprotein LEDGF/p75 in Human Cancer: A Study of 21 Tumor Types. *PLoSOne.* [Internet]. 2012 [Citado 2016 Nov 21];7(1):e30132. Disponible en: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0030132>
39. Ayaki M, Sueno T, Singh DP, Chylack LT, Shinohara T. Antibodies to lens epithelium-derived growth factor (LEDGF) kill epithelial cells of whole lenses in organ culture. *ExpEye Res.* 1999;69:139–42.
40. Bizzaro N, Tonutti E, Visentini D, et al. Antibodies to the lens and cornea in anti-DFS70-positive subjects. *Ann NY AcadSci.* 2007;1107:174–183.
41. Marlet J, Ankri A, Charuel JL, Ghillani-Dalbin P, Perret A, Martin-Toutain I, et al. Thrombophilia Associated with Anti-DFS70 Autoantibodies. *PLoS One.* [Internet]. Sep 2015 [Citado 2016 Nov 21];10(9):e0138671. Disponible en: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0138671>.

42. Rúa-Figueroa I. Sociedad Española de Reumatología: Manual SER de diagnóstico y tratamiento de las enfermedades reumáticas autoinmunes sistémicas. [Internet]. 2014 [Citado 2016 Nov 21]. Disponible en: http://www.ser.es/wp-content/uploads/2015/09/Manual_ERAS.pdf.