

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**

"Identificación y significado de los anticuerpos dirigidos  
contra antígenos celulares solubles definidos mediante  
Immunoblotting".

Francisco Javier López Longo

1992

A María Luisa, Blanca y Ana.

A mis padres.

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**

"Identificación y significado de los anticuerpos dirigidos contra antígenos celulares solubles definidos mediante Immunoblotting".

Trabajo presentado para optar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía por Francisco Javier López Longo, bajo la dirección del Profesor D. Luis Carreño Pérez.

1992

Dr. D. Luis Carreño Pérez, Jefe de Servicio de Reumatología del Hospital General Gregorio Marañón y Profesor Asociado de Medicina de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid.

Certifica: que D. Francisco Javier López Longo ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado "Identificación y significado de los anticuerpos dirigidos contra antígenos celulares solubles definidos mediante inmunoblotting", y expresa formalmente que reúne las condiciones exigibles para su presentación con el fin de acceder al grado de Doctor en Medicina.

Y para que así conste donde proceda, firmo la presente en Madrid, a 18 de Mayo de 1992.



Fdo. Luis Carreño Pérez



*Departamento de Medicina*

*Facultad de Medicina  
Universidad Complutense  
28040 Madrid*

DR. D. CARLOS PEREZAGUA CLAMAGIRAND, DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA DE LA FACULTAD DE MEDICINA. U.C.M.

INFORMA: Que este Departamento no tiene ningún inconveniente en que D. Francisco Javier López-Longo, presente su Tesis Doctoral titulada: "IDENTIFICACION Y SIGNIFICADO DE LOS ANTICUERPOS DIRIGIDOS CONTRA ANTIGENOS CELULARES SOLUBLES DEFINIDOS MEDIANTE INMUNOBLOTTING ", bajo la dirección del Profesor D. Luis Carreño Pérez, para proceder a su lectura y defensa ante Tribunal y, de esta manera, poder optar al Grado de Doctor.

Lo que firmo en Madrid a catorce de Mayo de mil novecientos noventa y dos.

EL DIRECTOR,

Fdo.: Prof. Dr. Carlos Perezagua Clamagirand



## AGRADECIMIENTOS

Al Profesor D. Luis Carreño Pérez por la dirección del trabajo, por su confianza y su amistad.

Al Profesor D. Henri-André Ménard y a todos los miembros de la Unidad de Enfermedades Reumáticas del CHUS, Université de Sherbroocke, Québec, Canadá, por haber facilitado e impulsado mi formación en el campo de la inmunoreumatología.

Al Profesor D. Eduardo Fernández-Cruz, en cuyo laboratorio se ha realizado gran parte de este trabajo, por su apoyo y confianza.

Al Hospital General "Gregorio Marañón" y a todos mis compañeros de los Servicios de Reumatología e Inmunología por su ayuda desinteresada.

Al Profesor Normand Lapointe del Hospital Ste-Justine de Montréal (Québec) y al Dr. D. Antonio Mera del Hospital General de Galicia, por su colaboración en el estudio clínico.

Gratitud especial a Gilles Boire, Indalecio Monteagudo, Margarita Rodríguez-Mahou y Milagrosa Escalona, que con su colaboración y estímulo han hecho posible la finalización de este trabajo.

## INDICE

Introducción	1
Justificación	8
Objetivos	10
Pacientes y métodos	11
Resultados	22
Discusión	44
Conclusiones	78
Resumen	83
Tablas	85
Anexo	119
Figuras	120
Bibliografía	124

## INTRODUCCION

El Lupus eritematoso sistémico y otras enfermedades reumáticas se caracterizan por la producción de anticuerpos dirigidos contra estructuras celulares propias, localizadas tanto en el núcleo como en el citoplasma. La mayoría de estos anticuerpos son antinucleares (AAN) y se detectan conjuntamente mediante inmunofluorescencia indirecta sobre cortes congelados de hígado o riñón de rata y/o monocapas de células tumorales mantenidas en cultivo (HEp-2, KB, etc). Un grupo importante de estos anticuerpos originan un patrón de inmunofluorescencia nuclear "moteado fino" y reaccionan con antígenos que pueden solubilizarse y extraerse de los tejidos con soluciones salinas de baja fuerza iónica. Estos antígenos fueron denominados ENA (extractable nuclear antigen). En 1972 Sharp y col (1) asociaron la presencia de anticuerpos dirigidos contra una fracción de los ENA sensible a ribonucleasa, el antígeno RNP o ribonucleoproteico, con una serie de rasgos clínicos característicos de lupus eritematoso sistémico, polimiositis y esclerodermia. Esta nueva entidad fue denominada enfermedad mixta del tejido conectivo y ENA se hizo sinónimo de antígeno RNP. En la actualidad se incluye bajo dicho término a diferentes antígenos (2). En general son proteínas nucleares no histonas, unidas frecuentemente a ácidos ribonucleicos (ARN) de pequeño tamaño (snRNP o small nuclear RNP) (3,4). Algunas son predominantemente citoplasmáticas (scrNP o small cytoplasmic RNP) y otras no

están unidas a ARN o solo aparecen en determinadas líneas celulares.

Las contradicciones observadas al estudiar la frecuencia y las correlaciones clínicas de los anticuerpos anti-ENA en las enfermedades reumáticas se deben en parte a las diferencias existentes en los extractos antigénicos y en las técnicas utilizadas para su detección. Los ENA se extraen habitualmente de timo de ternera o de conejo, o se obtienen a partir de extractos nucleares y/o citoplasmáticos de células mantenidas en cultivo (HeLa, WiL-2, etc). El antígeno Ro suele extraerse de bazo bovino o humano y de placenta humana. Las principales técnicas para detectar anticuerpos anti-ENA son la hemaglutinación pasiva y la precipitación en geles de agarosa, ésta última con dos variantes: inmunodifusión doble de Ouchterloni y contraelectroforesis. En los últimos años se han desarrollado técnicas más sensibles, como el ELISA (enzyme-linked immunoabsorbent assay), el immunoblotting o la precipitación inmune.

La hemaglutinación pasiva se basa en la capacidad de los anticuerpos anti-ENA para aglutinar hematíes recubiertos con ENA. La digestión con ribonucleasa antes de la incubación con los sueros permite diferenciar anticuerpos que reconocen ENA sensible a dicha enzima (anti-RNP). El grupo de anticuerpos detectados es heterogéneo, no se identifican algunos anticuerpos importantes (anti-Ro, anti-La, anti-Jol) y no pueden diferenciarse los anticuerpos anti-RNP de otros anti-ENA

sensibles a ribonucleasa, por lo que es una técnica poco utilizada.

La precipitación en geles de agarosa consiste en enfrentar antígenos y suero del paciente colocados en pozos practicados en un gel de agarosa. Ambos difunden libremente (inmunodifusión) o en un campo eléctrico (contrainmunolectroforesis) (5) a través del gel y al encontrarse originan un precipitado insoluble. Las líneas se identifican por comparación con sueros positivos conocidos. Son técnicas sencillas y rápidas, pero tienen el inconveniente de precisar unas concentraciones óptimas de antígeno y anticuerpo para la precipitación. Únicamente detectan anticuerpos precipitantes dirigidos contra antígenos solubles o degradados (6). Los extractos antigénicos utilizados están poco purificados y puede ser difícil identificar varios anticuerpos presentes en el mismo suero (7).

El ELISA es una técnica más sensible que la contrainmunolectroforesis y menos específica (8). El antígeno se fija en placas de poliestireno, se incuba primero con el suero del paciente y después con una antiinmunoglobulina humana marcada con una enzima. Tras añadir el cromógeno y el substrato adecuados la reacción se cuantifica con un espectrofotómetro. Es una técnica cuantitativa y permite conocer la clase de inmunoglobulina. Su mayor inconveniente es la necesidad de purificar el antígeno para no reducir su especificidad.

La precipitación inmune puede utilizarse para

caracterizar los ARN de pequeño tamaño precipitados por los anticuerpos anti-ENA (3). El suero del paciente se incuba con extractos salinos de células marcadas previamente con P32 y el precipitado se fracciona mediante electroforesis en geles de poliacrilamida. Los ARN marcados se identifican mediante autoradiografía. La técnica es muy sensible, pero requiere isótopos radiactivos y es muy laboriosa.

El immunoblotting consiste en enfrentar el suero del paciente (anticuerpos) con antígenos separados mediante electroforesis (9) y transferidos, en un campo eléctrico, a un papel de nitrocelulosa (10). Los antígenos se solubilizan con dodecil sulfato de sodio (SDS), que disgrega las proteínas en cadenas lineales cuya longitud es proporcional a su peso molecular, y la electroforesis se realiza en geles de poliacrilamida (11). Una vez transferidos al papel de nitrocelulosa se incuba éste con el suero del paciente y después con una antiinmunoglobulina humana marcada con una enzima. Al añadir el cromógeno y el substrato enzimático adecuados se colorea la reacción. El immunoblotting es una técnica específica, más sensible que la inmunodifusión o la contrainmunolectroforesis. No requiere antígeno puro y permite identificar los péptidos reactivos y la clase de inmunoglobulina (12,13). Dado que el extracto se desnaturaliza no identifica anticuerpos que reaccionan con epítopos conformacionales de la proteína nativa (14). La utilización de extractos semipurificados permite

identificar nuevos sistemas antígeno-anticuerpo que no precipitan en geles de agarosa (15).

Se han descrito numerosos anticuerpos anti-ENA, pero solo unos pocos son importantes desde el punto de vista clínico. Algunos se consideran hoy marcadores de enfermedad, como los anticuerpos anti-Sm en el lupus eritematoso sistémico, los anticuerpos anti-Jol en la polimiositis, o los anticuerpos anti-Scl70 en la esclerodermia (16,17). Los principales son los sistemas anti-RNP, anti-Sm, anti-Ro/SS-A, anti-La/SS-B, anti-Scl70 y anti-Jol.

Los anticuerpos anti-Sm (Smith) y anti-RNP fueron identificados mediante hemaglutinación pasiva e inmunodifusión enfrentando sueros de pacientes con lupus eritematoso sistémico y extractos de timo (1,18-20). Los antígenos son partículas ribonucleoproteicas nucleares de pequeño tamaño. Los anticuerpos anti-Sm definidos mediante inmunodifusión o contraelectroforesis precipitan varios tipos de U-ARN (U1, U2, U4, U5, y U6) y reconocen proteínas de peso molecular 28-29 Kd (BB') y 14 Kd (D) en inmunoblotting. Los anticuerpos anti-RNP precipitan exclusivamente U1-ARN o U2-ARN y reconocen proteínas de peso molecular 68-70 Kd, 33 Kd (A) y 22 Kd (C) (3,21). Los anticuerpos anti-Sm son prácticamente específicos de lupus eritematoso sistémico y se consideran marcadores de esta enfermedad (16,18), pero solo se detectan en un 30-40% de los pacientes (16). Los anticuerpos anti-RNP se encuentran en un 95-100% de los pacientes con enfermedad mixta del

tejido conectivo, aunque no son específicos. Se detectan en un 30-50% de lupus eritematoso sistémico y en un pequeño número de pacientes con otras conectivopatías (16).

Los anticuerpos anti-Ro fueron identificados por Clark y col (22) mediante técnicas de fijación de complemento, enfrentando sueros de pacientes lúpicos con un extracto salino de bazo humano. Mattioli y Reichlin (23) describieron los anticuerpos anti-La tras enfrentar sueros de pacientes con lupus eritematoso sistémico o con síndrome de Sjögren y un extracto de timo en técnicas de inmunodifusión. En otros estudios Alspaugh y Tan (24,25) detectaron anticuerpos en sueros de pacientes con síndrome de Sjögren que reaccionaban con antígenos presentes en extractos salinos de células WiL-2 y los denominaron anticuerpos anti-SSA y anti-SSB. Como resultado de la colaboración entre varios laboratorios, Alspaugh y Maddison (26) demostraron que los anticuerpos anti-Ro y anti-La eran inmunológicamente idénticos a los anticuerpos anti-SSA y anti-SSB o anti-Ha (27) respectivamente. Los antígenos Ro y La son complejos ribonucleoproteicos de pequeños tamaño situados preferentemente en el citoplasma (4,28). Los anticuerpos anti-Ro definidos mediante inmunodifusión o contrainmunolectroforesis precipitan varias clases de ARN citoplasmático humano (hY1, hY3, hY4, hY5) y reaccionan en immunoblotting con dos proteínas cuyo peso molecular es de 52 y 60 Kd (29-33). Ambos polipéptidos están unidos a ARN y forman una sola

partícula (33). Los anticuerpos anti-La precipitan ARN humanos y víricos, y reconocen una proteína de peso molecular entre 40 y 50 Kd con varios productos de degradación (7,34,35). Los anticuerpos anti-Ro se detectan en un 60-70% de pacientes con síndrome de Sjögren, en un 30-40% de pacientes con lupus eritematoso sistémico y en un pequeño número de casos con otras conectivopatías (16). Son muy frecuentes en el lupus eritematoso sistémico "ANN negativo" (36), en el lupus eritematoso cutáneo subagudo (37), en el lupus asociado a déficit de complemento (38) y en el lupus neonatal (39,40). Los anticuerpos anti-La se detectan mediante inmunodifusión o contraelectroforesis en un 50-60% de los pacientes con síndrome de Sjögren, en un 10-15% de lupus eritematoso sistémico, y en un pequeño número de pacientes con otras conectivopatías (16).

Los Anticuerpos anti-Scl 70 reconocen una proteína básica no histona asociada a los cromosomas (41) e identificada como la ADN-topoisomerasa I (42). Son característicos de esclerodermia y se detectan mediante inmunodifusión en un 30% de pacientes (41). Los anticuerpos anti-Jo 1 aparecen en un 30% de pacientes con polimiositis y en un 68% si se asocia además fibrosis pulmonar (43). Reaccionan con una subunidad 50 Kd de la enzima histidil- ARNt sintetasa (44).

## JUSTIFICACION

Los anticuerpos antinucleares se detectan conjuntamente mediante inmunofluorescencia indirecta sobre cortes congelados de tejido animal o monocapas de células tumorales humanas. Este método, muy sensible, es poco específico y la mayoría de los anticuepos detectados deben identificarse posteriormente por otros métodos (16,17). En el caso de los anticuerpos anti-ENA se utiliza habitualmente la inmunodifusión o la contrainmunolectroforesis (5). Estas técnicas presentan varios inconvenientes. Solo detectan anticuerpos precipitantes, se requiere una concentración adecuada de antígeno y anticuerpo para obtener la línea de precipitación y es necesaria una buena solubilización del antígeno aunque sea por degradación proteolítica (6). Los extractos están poco purificados y puede ser difícil diferenciar varios anticuerpos en un mismo suero, especialmente si existen líneas de identidad parcial (7) o reacciones inespecíficas (45).

El desarrollo de métodos inmunoenzimáticos, como el ELISA o el immunoblotting, proporciona sistemas de detección e identificación mucho más sensibles que la inmunodifusión o la contrainmunolectroforesis (8,15,46). El immunoblotting ha demostrado que algunos anticuerpos definidos mediante inmunodifusión o contrainmunolectroforesis son heterogéneos. Así, los anticuerpos anti-RNP reconocen tres polipéptidos y los anticuerpos anti-Sm reaccionan con otros dos diferentes,

todos ellos incluidos en las partículas snRNP (3,4). Los anticuerpos anti-Ro están dirigidos contra al menos dos polipéptidos diferentes (32,33). Los resultados obtenidos con ELISA e inmunoblotting obligan a reconsiderar la incidencia y la correlación clínica de los anticuerpos anti-ENA en las enfermedades reumáticas sistémicas y abren nuevas perspectivas desde el punto de vista diagnóstico. Su utilización está aun restringida a unos pocos laboratorios. El ELISA es sencillo y rápido, pero se requieren protocolos sofisticados de purificación para que la detección sea específica. Los sistemas comercializados son caros y no diferencian los anticuerpos dirigidos contra cada uno de los polipéptidos de las partículas snRNP y scRNP. El inmunoblotting identifica los anticuerpos dirigidos contra cada uno de los diferentes polipéptidos. No requiere una purificación rigurosa de los antígenos y permite detectar nuevos anticuerpos. Los principales problemas son la reproductibilidad y la laboriosidad de la técnica.

En la actualidad es evidente la necesidad de disponer de técnicas alternativas que confirmen los resultados obtenidos mediante contrainmunolectroforesis o inmunodifusión. El inmunoblotting puede ser útil además en el diagnóstico y clasificación de los pacientes con enfermedades reumáticas autoinmunes.

## **OBJETIVOS**

El objetivo general de este trabajo ha sido desarrollar un protocolo de inmunoblotting sencillo y reproducible para detectar e identificar anticuerpos anti-ENA.

Se fijaron los siguientes objetivos concretos:

- 1.- Obtener antígenos solubles de tejido humano o animal (ENA) con métodos sencillos, sin recurrir a protocolos laboriosos de purificación ni a cultivos celulares.
- 2.- Desarrollar un inmunoblotting reproducible que permitiera detectar simultáneamente los diferentes anticuerpos anti-ENA.
- 3.- Comparar los resultados obtenidos mediante contraelectroforesis e inmunoblotting en pacientes con lupus eritematoso sistémico y otras conectivopatías.
- 4.- Estudiar la incidencia y la correlación clínica de los principales anticuerpos anti-ENA en las enfermedades reumáticas sistémicas.

## **PACIENTES Y METODOS**

Este trabajo se ha desarrollado en los laboratorios de Autoinmunidad (Servicio de Inmunología) y del Pabellón de Medicina y Cirugía Experimental del Hospital General "Gregorio Marañón" de Madrid. Los pacientes procedían de los Servicios de Reumatología, Nefrología y Medicina Interna de este hospital, del Servicio de Reumatología del Hospital General de Galicia (Santiago de Compostela) y del Servicio de Inmunoreumatología y Alergia del Hospital Pediátrico Ste-Justine de Montréal (Québec).

### **Preparación de los extractos antigénicos**

Los antígenos RNP, Sm, Jo-1, Scl-70 y La se obtuvieron a partir de un extracto comercial de timo de conejo. El antígeno Ro se extrajo directamente de placenta humana.

#### **1.-Preparación del extracto de timo de conejo.**

Se utilizó timo de conejo extraído con acetona y liofilizado (RTE, Pel Freeze Biologicals Rogers, Ark). La extracción se realizó a 4°C siguiendo el protocolo de Kurata y Tan (5) con algunas modificaciones. Todas las soluciones contenían phenylmethylsulphonylfluoride (PMSF) 1mM. El extracto de timo se disolvió en Tris-ClH 50 mM/ClNa 350 mM (pH:7,4) a una concentración de 90 mg/ml. y se extrajo durante 4 horas mediante agitación vigorosa. Tras una centrifugación de 45 minutos a 10.000 g el sobrenadante fue liofilizado y almacenado a -40° C hasta su utilización como fuente de antígeno. En otros ensayos

se usaron diferentes concentraciones de ClNa (150 mM, 400 mM y 1M).

## 2.-Preparación del extracto de placenta humana.

Se preparó siguiendo el método de Clark y col (22), con algunas modificaciones (14). Las diferentes etapas de purificación se desarrollaron a 4°C. Todas las soluciones contenían Na<sub>2</sub>N<sub>3</sub> 0.002%, dithiothreitol 1,5 mM y PMSF 1 mM. Las placentas se obtuvieron, con el consentimiento correspondiente, de mujeres sanas y tras partos eutócicos a término. Una vez eliminado el tejido fibroso fueron troceadas, pesadas y congeladas a -70°C. En cada extracción se homogeneizó la placenta en Tris-ClH 50 mM/ClNa 120 mM (pH=7.4) (Solución A) manteniendo una relación peso:volumen de 1:4. El homogeneizado se centrifugó 45 minutos a 15.000 g y el sobrenadante se mezcló durante 1 hora con diethylaminoethylcelulosa (DEAE-52, Whatman, England), hidratada y equilibrada previamente con la solución A. Se utilizaron 500 mg. de DEAE por gramo de tejido homogeneizado. Las proteínas unidas a la resina fueron eluidas con Tris-ClH 50 mM/ClNa 300 mM (pH:7,4). El eluido fue dializado contra un volumen 10 veces superior de acetato de amonio 50 mM (pH:7), liofilizado y almacenado a -70°C hasta su utilización como fuente de antígeno. En otros ensayos se extrajeron las proteínas solubles con diferentes concentraciones de ClNa (150 mM, 500 mM y 1 M).

## IMMUNOBLOTTING

La electroforesis en geles de poliacrilamida se realizó según el método de Laemmli (9). Los extractos de timo o de placenta se disolvieron en glicerol 10%/Tris-ClH 25 mM/2-mercaptoetanol 10%/SDS 2,5% (pH:6,8), manteniendo una concentración de 8 mg/ml. Posteriormente fueron hervidos durante 5 minutos y se centrifugaron 1 minuto a 12.000 g. Los sobrenadantes, a razón de 100µl por gel, fueron sometidos a electroforesis en geles discontinuos de poliacrilamida con una concentración de acrilamida-bisacrilamida correspondiente a un 10%, 12%, 15% o 18%. La electroforesis se realizó en glicina 192 mM/Tris-ClH 25 mM/SDS 0,1% (pH:8,3), a 200 voltios y durante 45 minutos en un sistema Mini Protean II Cell (Bio Rad, Richmond, CA).

Las proteínas desnaturalizadas fueron transferidas desde el gel a un papel de nitrocelulosa (Amersham, England) según el método de Towbin y col (10). Los geles habían sido equilibrados previamente durante 30 minutos en Tris-ClH 25 mM/glicina 192 mM/SDS 0,1%/metanol 20% (pH:8,3) (Solución B). La transferencia se realizó en la solución B sin SDS, durante 75 minutos a 100 voltios y utilizando el mismo aparato que en la electroforesis. Tras la transferencia los papeles fueron bloqueados durante un mínimo de 12 horas con Tris-ClH 10 mM/ClNa 150 mM/albúmina bovina 3% (pH:7,4).

La incubación de los papeles de nitrocelulosa con los sueros de los pacientes se realizó en un incubador

múltiple 28x2 Miniblotter II Apparatus (Immunitics, Cambridge, MA). Antes de la incubación los papeles fueron lavados con Tris-ClH 10 mM/ClNa 150 mM/Tween 20 0,1% /albúmina bovina 0,5% (TBS-150) (pH:7,4) durante 10 minutos. Una vez colocados el papel y los sueros cada minicámara contenía aproximadamente 10-20 µg. de extracto en contacto con 50 µl de uno de los sueros diluido 1:5 en TBS-150. Tras 75 minutos de incubación el papel fue lavado 5 veces con TBS-150. En algunos ensayos se substituyó el Tween-20 por Tritón-X.

Las inmunoglobulinas de clase G unidas al papel fueron detectadas con una anti-IgG humana de cabra, conjugada con peroxidasa (Nordic, England), y 4-cloro 1-naftol como substrato. Se incubó el papel con anti-IgG diluida 1:1000 en TBS-150 durante un mínimo de 12 horas a 4°C. Posteriormente se lavó el papel con Tris-ClH 10 mM/ClNa 1M (pH:7,4), dos veces añadiendo Tween-20 0,1% y una vez sin el detergente. Tras el último lavado se añadió 4-cloro 1-naftol 40% en metanol 20% y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% para visualizar la reacción.

#### **OTRAS TECNICAS**

Los resultados del immunoblotting se confirmaron mediante ELISA, contraimmunoelectroforesis o inmunodifusión. Se utilizaron sistemas Rheuma-ELISA (Whittaker Bioproducts, NC) para detectar la presencia de anticuerpos anti-RNP, anti-Sm y anti-Ro/SSA, La contraimmunoelectroforesis se realizó según el método de

Kurata y Tan (5), utilizando una cámara de electroforesis ATOM AC/5. Se preparó agarosa 1% y 0,6% en solución fosfato salina (PBS) 0,5 M (pH:7,4) con polietilenglicol (PEG) 1%. Se colocaron 0,5 ml de agarosa 1% en cada porta y tras su secado a temperatura ambiente se añadieron 3 ml de agarosa 0,6%. Una vez polimerizada se practicaron pocillos en paralelo con un trócar de 4 mm. de diámetro, manteniendo una separación entre ellos de 3,5-4 mm. Los sueros fueron deplementados a 56° C en PBS durante 30 minutos. Se colocaron 50 µl de suero sin diluir en cada pocillo y 50 µl de antígenos disuelto en PBS (20-30 mg/ml) en el opuesto. Se aplicó una corriente de 3 mA por cada porta durante 45 minutos. Una vez lavados con una solución de citrato los portas fueron guardados en una cámara húmeda y tras 24 horas se procedió a la lectura. Mediante contraelectroforesis se detectaron anticuerpos anti-RNP, anti-Sm, anti-Ro, anti-La y anti-Jo 1. Los anticuerpos anti-Scl 70 se confirmaron utilizando inmunodifusión en placas de Petri (100x15 mm). Se colocaron 15 ml de agarosa 4% /PBS /0,5 M/ PEG 1% (pH:7,4) y tras la polimerización se hicieron 6 pocillos alrededor de otro central con un trócar de 8 mm de diámetro, manteniendo una separación entre ellos de 4 mm. Los sueros deplementados y los controles positivos se colocaron sin diluir y de forma alterna en los pocillos periféricos (50 µl/pocillo). En el centro se depositaron 50 µl de antígenos en PBS (60-80 mg/ml). Las placas se guardaron en una cámara húmeda a temperatura ambiente

hasta que aparecieron líneas de precipitación bien desarrolladas en los controles.

En algunos casos se utilizaron anticuerpos eluidos del papel de nitrocelulosa para verificar su especificidad (47-49). Para ello, una vez transferido el antígeno, se cortaron dos tiras verticales de 1 cm de ancho a cada lado del papel. El resto se incubó durante un mínimo de 18 horas a 4° C con un suero positivo para el anticuerpos que se pretendía eluir. Las tiras verticales se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente con el mismo suero y después con anti-IgG humana conjugada con peroxidasa. Al día siguiente se completó el immunoblotting. Las zonas de unión de los anticuerpos a cada polipéptido se localizaron en el papel con las dos tiras verticales y dichas zonas se cortaron horizontalmente. Cada tira horizontal, correspondiente a un anticuerpo, se dividió en fragmentos de 2-3 mm y se depositó en un tubo cónico de 1 ml. Los anticuerpos se eluyeron por agitación en 200 µl de Tris-ClH 10 mM/ glicina 100 mM/ Tween-20 0,1% (pH:2,5), 10 minutos a temperatura ambiente. El eluido se neutralizó en 20 µl de Tris-ClH 1M (pH:8) y se añadió albúmina bovina 0,5% para su utilización en el immunoblotting.

#### **PACIENTES**

Entre octubre de 1987 y octubre de 1991 se recolectaron 1654 sueros de 800 pacientes. El único criterio de selección fue el presentar rasgos de conectivopatía u otra enfermedad reumática. El diagnóstico

se estableció en base a los datos clínicos, serológicos y radiológicos característicos de cada enfermedad. Se utilizaron los criterios comúnmente aceptados para el diagnóstico de lupus eritematoso sistémico (50), artritis reumatoide (51), esclerodermia (52), polimiositis (53), síndrome de Sjögren (54) y enfermedad mixta del tejido conectivo (55). Los pacientes que presentaban rasgos sugerentes de conectivopatía pero no cumplían ninguno de los criterios se consideraron como conectivopatías no definidas.

La historia clínica completa de cada paciente se revisó en el momento de entrar en el estudio, en base a los datos contenidos en el protocolo que figura en los anexos 1 y 2. Cada uno de los parámetros fue definido según criterios aceptados (56,57). En la artritis reumatoide los grados radiológico y funcional se establecieron en base a la clasificación de progresión de enfermedad y a la clasificación de Steinbrocker (56). En posteriores revisiones se utilizó este mismo protocolo. Los estudio radiológicos, oftalmológicos, gammagráficos e histológicos solo fueron solicitados en los casos en que fueron necesarios para el diagnóstico o el adecuado manejo del paciente. En todos los pacientes se disponía de radiografías recientes de tórax y de manos.

Al final del estudio los pacientes fueron distribuidos en tres grupos:

A.- Enfermedad reumática inflamatoria con alta probabilidad de presentar anticuerpos anti-ENA: lupus

eritematoso sistémico y variantes lúpicas, esclerodermia, polimiositis, enfermedad mixta del tejido conectivo, síndrome de Sjögren primario, fenómeno de Raynaud primario (excluidos arterioesclerosis y causas locales) y conectivopatía no definida.

B.- Enfermedad reumática inflamatoria con baja probabilidad de presentar anticuerpos anti-ENA: artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, artritis psoriásica, síndrome de Reiter, artritis reactiva, polimialgia reumática y vasculitis no asociadas a conectivopatías.

C.- Otras enfermedades, reumáticas o no, con muy baja probabilidad de presentar anticuerpos anti-ENA.

La distribución de los diagnósticos se especifica en las tablas 1, 2 y 3.

#### SUEROS

Los sueros fueron almacenados a  $-70^{\circ}$  C en alicuotas de 0,5 ml. En la estandarización del inmunoblotting y en todos los estudios (inmunodifusión, contrainmunolectroforesis, ELISA e inmunoblotting) se utilizaron sueros controles positivos y negativos. Los controles positivos procedían del "ANA Reference Laboratory" del Centro de Control de Enfermedades de Atlanta (58), del Laboratorio de Autoinmunidad del Hospital General "Gregorio Marañón" de Madrid (M. Rodríguez-Mahou) y del Laboratorio de Inmunoreumatología del CHUS de la Universidad de Sherbrooke, Québec (HA.

Ménard). Todos los controles positivos fueron verificados mediante contraelectroforesis o inmunodifusión, ELISA e inmunoblotting. El peso molecular de los polipéptidos reconocidos por los diferentes anticuerpos en el inmunoblotting se calculó por comparación la movilidad electroforética (Rf) de proteínas de peso molecular conocido (Low molecular weight markers, Pharmacia, Sweden). Como controles negativos se utilizaron 55 sueros de donantes sanos del Banco de Sangre verificados igualmente con todas las técnicas.

#### **Definición de los resultados positivos**

Todos los sueros fueron estudiados por duplicado sin diluir (inmunodifusión/contraelectroforesis) o diluidos 1:5 (inmunoblotting) ó 1:100 (ELISA). En el caso del inmunoblotting y del ELISA solo se valoraron anticuerpos de la clase IgG. El protocolo de lectura y el análisis de los resultados en cada técnica fueron los siguientes:

##### **A.- Inmunoblotting.**

La lectura fue realizada de forma independiente por dos observadores, inmediatamente después de visualizarse la reacción y a las 24 horas. Para facilitarla se habían utilizado 4 sueros de referencia negativos y 6 positivos en cada papel, dispuestos en "espejo" a ambos lados. Se consideró la presencia de un determinado anticuerpo cuando:

- el suero reconocía una banda de movilidad

electroforética idéntica (mismo peso molecular) a las presentes en los sueros positivos utilizados como controles.

- la reacción era específica y no desaparecía a las 24 horas.
- aparecían correctamente todos los controles positivos y negativos.

En los casos dudosos la especificidad de la reacción se verificó utilizando anticuerpos eluidos del papel de nitrocelulosa y/o variando la relación acrilamida-bisacrilamida del gel.

#### B.- Contrainmunolectroforesis/inmunodifusión

La lectura se realizó a las 24 y a las 48 horas. Se consideró la presencia de un determinado anticuerpo cuando existía una reacción de identidad total en las líneas de precipitación formadas por el suero problema y el suero control positivo.

#### C.- ELISA

Se calculó el "cut-off" de cada anticuerpo utilizando 90 sueros de donantes del Banco de Sangre. La lectura se hizo a 400 nm con una referencia de 620 nm y se consideró la media de los controles negativos y tres desviaciones estandar. Se aceptó la presencia de anticuerpos cuando los valores de absorbancia eran superiores a 0,44 (anticuerpos anti-RNP), 0,17 (anticuerpos anti-Sm) y 0,60 (anticuerpos anti-Ro/SSA).

## ESTADISTICA

La comparación de los subgrupos con y sin cada uno de los anticuerpos se realizó mediante la prueba de chi cuadrado (con corrección de Yates si estaba indicado), el test exacto de Fisher o el test de la t de Student. Se consideraron significativos valores de p inferiores a 0,05. Se calculó la razón de predominio u "odds ratio" (OR) en cada caso. Cuando uno de los valores de la tabla 2x2 fue cero se utilizó el método de Fleiss (59), consistente en añadir 0,5 a cada uno de los valores de la tabla. En el análisis de los datos se utilizó un ordenador Foxen con microprocesador 80286 a 16 MHz y un programa R.Sigma 1.0.

## RESULTADOS

La elección del protocolo de extracción de los antígenos y la estandarización de la técnica de immunoblotting se realizaron en base a los patrones reconocidos por los sueros de referencia positivos y negativos.

### 1.- Estandarización de la técnica de immunoblotting.

#### 1.-Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS.

Se utilizaron diferentes concentraciones de acrilamida y bisacrilamida a fin de obtener una buena resolución de los 6 controles de peso molecular. Si se utilizaban geles con un valor T 10% o 12%, el recorrido del frente proteico era excesivo y se perdían los controles de menor peso molecular. Con una relación acrilamida-bisacrilamida correspondiente a un T:15% o 18% se definieron en el gel los 6 marcadores de peso molecular (Fig 1)(tabla 4): fosforilasa B (94 Kd), albúmina (67 Kd), ovoalbúmina (43 Kd), anhidrasa carbónica (30 Kd), inhibidor tripsina (20,1 Kd) y alfa-lactoalbúmina (14,4 Kd). En base a dichos resultados y con el objetivo de calcular el peso molecular de los polipéptidos reconocidos por los sueros de referencia positivos, se decidió trabajar con geles T:15% o 18%

El sistema de electroforesis admitía un volumen de extracto de 100 µl. Dado que se había preparado una concentración de 8 mg/ml se aplicaron 800 µg en cada gel. Con dicha cantidad de antígeno la electroforesis se

desarrollaba sin distorsiones y con una calidad similar a los ensayos realizados con menos antígeno. La aplicación de 1200-1400 µg. no saturaba el gel pero aparecían algunas distorsiones, por lo que se decidió utilizar siempre una cantidad de antígeno entre 800 y 1000 µg por gel (Fig 1).

## 2.-Transferencia al papel de nitrocelulosa e immunoblotting.

Con las condiciones establecidas no existieron problemas de transferencia en ninguno de los ensayos. Tras la incubación con sueros positivos diluidos 1:20 se probaron diferentes protocolos de lavado variando la concentración de ClNa y el detergente (Tween-20 o Tritón-X). Con ClNa 150 mM y Tween-20 0,1% y repitiendo cinco veces los lavados antes de la incubación con anti-IgG humana, la coloración inespecífica era escasa y no se eliminaba ninguno de los antígenos objeto del estudio. El Tritón-X fue desechado dado que desaparecían algunas de las reacciones. Tras la incubación con anti-IgG la coloración inespecífica era menor si se lavaba con ClNa 1M.

Una vez decidido el protocolo de lavado idóneo se procedió a variar la dilución de los sueros. Se compararon los resultados obtenidos con sueros de referencia positivos y negativos diluidos 1:2, 1:5 1:10, 1:20 y 1:40. La coloración inespecífica no impidió la identificación de las reacciones en ninguno de los casos. Al diluir el suero a 1:20 y 1:40 se perdieron algunas reacciones positivas débiles, pero los resultados eran similares con el resto

de las diluciones. Los 55 sueros negativos permitieron analizar las reacciones inespecíficas. Si la dilución era 1:2 aparecían en un 72% de los sueros, si era 1:5 aparecían en un 29% y si era 1:10 en un 25%. En ninguno de los casos coincidían con los patrones obtenidos con los sueros de referencia positivos por lo que se decidió utilizar una dilución 1:5 en todos los ensayos (Fig 2,3 y 4).

### 3.- Anticuerpos detectados con el extracto de timo de conejo.

Los patrones reconocidos por los sueros de referencia positivos fueron idénticos en las tres extracciones de timo de conejo comercial (Fig 2 y 3). El cálculo del peso molecular de cada polipéptido se resume en las tablas 5 y 5a. El reconocimiento simultáneo de los anticuerpos se vio facilitado por la actividad antigénica de los productos de degradación de los antígenos La y Scl-70. En ambos casos se repitió el mismo patrón para cada extracto. Los sueros anti-La reconocían tres polipéptidos (45, 37 y 35 Kd) y los sueros anti-Scl-70 otros seis (100, 86, 65, 56, 39 y 25 Kd). Las reacciones más intensas se producían con los polipéptidos de 45 y 65 Kd respectivamente. Los sueros de referencia anti-RNP reaccionaban fuertemente con dos polipéptidos, de 70 Kd y 33 Kd (A), y reconocían otro de 22 Kd (C). Los sueros anti-Sm reaccionaban con un doblete de 28-29 Kd (BB') y con un polipéptido de 14 Kd (D), aunque algunos reconocían debilmente los péptidos de 70 Kd y A (RNP). El suero anti-Jo 1 reaccionaba con un

polipéptido de 46 Kd. Ninguno de los 55 sueros utilizados como control negativo reaccionaba con dichos polipéptidos. Al comparar extractos obtenidos con diferentes concentraciones de ClNa se observaron variaciones en la reproductibilidad de los resultados. Con ClNa 350 mM se obtenían de forma constante los patrones de referencia completos. Con ClNa 150 mM se detectaban mal los anticuerpos anti-C y anti-BB', y con ClNa 400 mM no se visualizaban los anticuerpos anti-70 Kd (RNP) y era difícil identificar sueros anti-Scl 70.

#### 4.- Anticuerpos detectados con el extracto de placenta humana.

Los patrones reconocidos por los sueros de referencia positivos fueron idénticos en las cinco extracciones de placenta (Fig 4). El cálculo de los pesos moleculares se resume en las tablas 5 y 5b. Los sueros de referencia anti-Ro reaccionaban con polipéptidos de 60 Kd y/o 52d Kd y los sueros anti-La con otros dos de 45 y 37 Kd, manteniéndose constante dicho patrón. Ninguno de los 55 sueros utilizados como control negativo reaccionaba con dichos polipéptidos. Las mejores imágenes se obtenían cuando se utilizaba antígeno extraído con ClNa 300 mM.

#### 5.- Estudio de los sueros mediante inmunoblotting y lectura de los resultados.

En base a los datos del apartado anterior todos los estudios se realizaron bajo las siguientes condiciones:

-tímero de conejo extraído con Tris-ClH 50 mM/ClNa 350 mM.

-placenta humana extraída con Tris-ClH 50 mM/ClNa 300 mM.

-electroforesis en geles con una relación de acrilamida- bisacrilamida correspondiente a un T:15% o 18% La cantidad de extracto en cada gel era aproximadamente de 800 µg.

-sueros diluidos 1:5 y lavados del papel con Tween-20.

La coincidencia de los observadores fue superior al 90% en la primera lectura y del 100% en la segunda. No existieron problemas de coloración inespecífica. Un 6% (12/208) de los papeles de nitrocelulosa incubados fueron rechazados por mala definición o ausencia de alguna de las reacciones en los sueros de referencia positivos. Los pocos sueros cuya interpretación era dudosa fueron verificados en geles con una relación acrilamida-bisacrilamida correspondiente a un T:12%. La especificidad fue confirmada utilizando anticuerpos eluidos del papel de nitrocelulosa y ELISA.

## 2.- Resultados del immunoblotting con el extracto de timo.

Se estudiaron 998 sueros de 537 pacientes (tabla 6). En 34 (6,3%) pacientes se detectaron anticuerpos anti-La, en 12 (2,2%) anticuerpos anti-Scl 70 y en 2 (0,3%) anticuerpos anti-Jo 1. Los más frecuentes fueron los anticuerpos anti-A (8%), anti-BB' (7,8%) y anti-70 Kd (7,4%). En 36 pacientes (6,7%) existían anticuerpos anti-C

y en 21 (3,9%) anticuerpos anti-D. La mayoría de las reacciones específicas no identificadas se debían a anticuerpos contra polipéptidos de 58 Kd y 44 Kd. Se detectaron anticuerpos anti-58 Kd en 72 pacientes (13,4%) y anti-44 Kd en 91 (16,9%), siendo estos últimos los más frecuentes en todo el estudio.

Las tablas 7 y 8 muestran la distribución de los diagnósticos para cada uno de los anticuerpos. Los más frecuentes en el grupo de pacientes con anticuerpos anti-La fueron el lupus eritematoso sistémico (41%), el síndrome de Sjögren primario (23%) y la artritis reumatoide (17,6%). Los anticuerpos anti-Scl 70 se detectaron en 10 pacientes con esclerodermia (83%) y en 2 con enfermedad de Raynaud primaria. Los 2 pacientes con anticuerpos anti-Jo 1 presentaban polimiositis. Los anticuerpos anti-RNP aparecieron preferentemente en individuos con lupus eritematoso sistémico o con enfermedad mixta del tejido conectivo. El 62% de los portadores de anticuerpos anti-70 Kd estaba diagnosticado de lupus eritematoso sistémico y solo el 35% tenía enfermedad mixta del tejido conectivo. La distribución era similar en el caso de los anticuerpos anti-A y el lupus eritematoso sistémico era algo más frecuente en los pacientes con anticuerpos anti-C (75%). Los anticuerpos anti-BB' y anti-D aparecieron mayoritariamente en el lupus eritematoso sistémico. Los casos de enfermedad mixta con anticuerpos anti-BB' o anti-D correspondían a pacientes que habían desarrollado lupus eritematoso sistémico. Los

anticuerpos anti-D eran prácticamente específicos de dicha enfermedad puesto que la paciente diagnosticada de conectivopatía no definida con anticuerpos anti-BB' y anti-D presentaba artritis no erosiva, AAN y anticuerpos anti-ADN nativo elevados (3 criterios de lupus eritematoso sistémico). El análisis de las diferentes combinaciones de anticuerpos dirigidos contra los polipéptidos 70 Kd, A, C, BB' y D mostró una distribución similar de los diagnósticos (tabla 9 y 10). Los anticuerpos anti-RNP sin anti-Sm se detectaron en un número similar de lupus eritematoso sistémico (46%) y enfermedad mixta del tejido conectivo (43%), y los anticuerpos anti-Sm sin anti-RNP correspondían en un 82% de casos a lupus eritematoso sistémico. En 2 pacientes con artritis reumatoide existían únicamente anticuerpos anti-BB'. Ambos sueros fueron confirmados mediante ELISA. La asociación de anticuerpos anti-RNP y anti-Sm era exclusiva de lupus eritematoso sistémico, incluyendo 3 pacientes que en su inicio cumplían criterios de enfermedad mixta del tejido conectivo.

Los anticuerpos anti-58 Kd y anti-44 Kd aparecieron en diferentes enfermedades (tabla 11). Los diagnósticos más frecuentes fueron el lupus eritematoso sistémico (36 y 38%) y la artritis reumatoide (33 y 31%).

### 3.- Resultados del inmunoblotting con extracto de placenta.

Se estudiaron 1709 sueros de 855 pacientes (tabla

12). En 48 (5,6%) se detectaron anticuerpos anti-La, en 55 (6,4%) anticuerpos anti-Ro 52 Kd y en 75 (8,7%) anticuerpos anti-Ro 60 Kd. Un 3,9% de los pacientes presentaba anticuerpos contra ambos polipéptidos. En 103 pacientes (12%) se detectaron anticuerpos dirigidos contra una proteína de 48 Kd no identificada previamente.

La tabla 13 muestra la distribución de los diagnósticos para cada uno de los anticuerpos. Los más frecuentes en el grupo de pacientes con anticuerpos anti-La fueron el lupus eritematoso sistémico (43%), el síndrome Sjögren primario (18%) y la artritis reumatoide (18%). Esta misma distribución se observó en el caso de los anticuerpos anti-Ro 52 Kd, que se detectaron en el 58% de los pacientes con lupus eritematoso sistémico y en el 16% de individuos con síndrome de Sjögren primario o artritis reumatoide. Los anticuerpos anti-Ro 60Kd aparecieron preferentemente en el lupus eritematoso sistémico (53%) y en la artritis reumatoide (34%) rara vez en el síndrome de Sjögren primario (1,3%).

El análisis de los anticuerpos anti-Ro 52 Kd y anti-Ro 60 Kd asociados y de cada uno de ellos separadamente mostró algunas diferencias (Tabla 14). La asociación de ambos anticuerpos apareció casi siempre en el lupus eritematoso sistémico (79%) o en la artritis reumatoide (17%), pocas veces en el síndrome de Sjögren primario (2,9%). El primer diagnóstico en el grupo de pacientes con anticuerpos anti-Ro 52 Kd sin anti-Ro 60 Kd fue el síndrome de Sjögren primario (38%), seguido del lupus

eritematoso sistémico (23%) y la artritis reumatoide (14%). En el caso de los anticuerpos anti-Ro 60 Kd sin anti-Ro 52 Kd los diagnósticos más frecuentes fueron la artritis reumatoide (48%) y el lupus eritematoso sistémico (31%) y no aparecieron en el síndrome de Sjögren primario. Todos los niños con lupus neonatal presentaron anticuerpos anti-Ro 52 Kd. Los anticuerpos anti-Ro de pacientes con lupus eritematoso cutáneo reconocían el Ro 60 Kd.

La distribución de los anticuerpos anti-Ro y anti-La asociados era similar (tabla 15). Un 89% de los pacientes con anticuerpos anti-Ro 52 Kd, anti-Ro 60 Kd y anti-La presentaba lupus eritematoso sistémico. El principal diagnóstico en caso de coincidencia de anticuerpos anti-Ro 60 Kd y anti-La era la artritis reumatoide (50%) y en pacientes con anticuerpos anti-Ro 52 Kd y anti-La era el síndrome de Sjögren primario. Los anticuerpos dirigidos contra la proteína de 48 Kd eran exclusivos de la artritis reumatoide.

#### **4.- Comparación de los resultados obtenidos mediante inmunoblotting y contraimmunoelectroforesis con extracto de timo.**

En 367 sueros se determinó la presencia de anticuerpos anti-ENA mediante contraimmunoelectroforesis ó inmunodifusión (tabla 16). El inmunoblotting identificó un mayor número de sueros con anticuerpos anti-La, anti-RNP y anti-Sm. Más de un 50% de dichos sueros identificados mediante inmunoblotting como anti-RNP o anti-Sm

presentaban contraelectroforesis negativa. De estos, 30 fueron estudiados mediante ELISA y se confirmó la existencia de los anticuerpos en 27 (90%).

Los sueros definidos mediante contraelectroforesis como anti-RNP sin anti-Sm presentaron una frecuencia similar de anticuerpos anti-70 Kd, anti-A y anti-C, pero también reconocían BB' (23%) y D (5,8%). Los anticuerpos anti-70 Kd, anti-A y anti-C aparecieron en muchos sueros definidos como anti-Sm sin anti-RNP por la contraelectroforesis (tabla 17). Todos los sueros con anticuerpos anti-Sm en contraelectroforesis, con o sin anticuerpos anti-RNP, reconocieron el péptido D en immunoblotting.

#### **5.-Comparación de los resultados obtenidos mediante immunoblotting y contraelectroforesis con extracto de placenta.**

Los resultados obtenidos en 480 sueros se resumen en la tabla 18. El immunoblotting detectó todos los sueros anti-La y la contraelectroforesis solo el 58%. De los 153 sueros con anticuerpos anti-Ro, todos ellos verificados mediante ELISA, la contraelectroforesis detectó el 80% y el immunoblotting el 75%. En 30 (19,6%) la contraelectroforesis fue negativa y el immunoblotting positivo, en otros 37 (24%) ocurrió lo contrario. Ambas técnicas coincidieron solo en el 56% de los casos.

Los sueros definidos como anti-Ro mediante

contraimmunoelectroforesis reconocieron el Ro 52 Kd (45%), el Ro 60 Kd (28%) o ambos (27%). La distribución fue diferente en los 30 sueros con anticuerpos anti-Ro en immunoblotting y contraimmunoelectroforesis negativa. En 22 (73%) reaccionaron con el Ro 60 Kd, en 4 (13%) con el Ro 52 Kd y en otros 4 (13%) con ambos (tabla 19).

#### **6.-Anticuerpos anti-ENA en el lupus eritematoso sistémico y en variantes lúpicas.**

En los 127 pacientes con lupus eritematoso sistémico el immunoblotting mostró la presencia de anticuerpos anti-ENA en 92 casos (72,5%), aunque en 14 de los negativos solo se había estudiado un suero. Los anticuerpos identificados fueron los siguientes:

--anticuerpos anti-RNP en 42 (33%): anti-70 Kd en 25 (19,6%), anti-A en 28 (22%) y anti-C en 27 (21,2%). Se detectaron anticuerpos anti-RNP sin anti-Sm en 14 pacientes (11%) y con anti-Sm en otros 28 (22%).

--anticuerpos anti-Sm en 42 (33%): anti-BB' en 36 (28,3%) y anti-D en 19 (14,9%). Se detectaron anticuerpos anti-Sm sin anti-RNP en 14 casos (11%).

--anticuerpos anti-La en 21 (16,5%), anti-58 Kd en 29 (22,8%) y anti-44 Kd en 36 (28,3%).

--anticuerpos anti-Ro en 45 (35,4%): anti-Ro 52 Kd en 32 (25,1%) y anti-Ro 60 Kd en 40 (31,4%). Se detectaron anticuerpos anti-Ro 52 Kd sin anti-Ro 60 Kd en 5 (3,9%), anticuerpos anti-Ro 60 Kd sin anti-Ro 52 Kd en 13 (10,2%) y ambos en 27 (21,2%). La coincidencia de los anticuerpos anti-Ro y anti-La se

observó preferentemente con los anticuerpos anti-Ro 52 Kd y anti-Ro 60 Kd asociados (17 casos, 13,3%).

El protocolo clínico fue completado en 107 pacientes con lupus eritematoso sistémico. La edad media era 39 años (12-76 años) y 94 (87,8%) eran mujeres. El tiempo medio de evolución era 9 años (0,5-29 años). Los principales hallazgos se resumen en las tablas 20 y 21. En 106 pacientes (99%) se detectaron AAN mediante inmunofluorescencia indirecta sobre cortes congelados de hígado y riñón de rata y/o células HEp-2. El patrón fue homogéneo en 71 (66,5%), moteado en 15 (14%) y mixto en 22 (20,5%). En 86 casos (80,3%) se detectaron mediante radioinmunoensayo niveles elevados de anticuerpos anti-ADN nativo (superiores a 20 u/ml) en algún momento de la evolución. La disminución de las fracciones C3 y C4 del complemento se observó en un 65,4% y en un 84,1% respectivamente. En 34 (31,7%) se detectó factor reumatoide superior a 40 u/ml (nefelometría). En 31 pacientes con nefropatía se realizó biopsia renal. Los diagnósticos fueron: glomerulonefritis membranoproliferativa difusa en 18 (58%), glomerulonefritis membranosa en 6 (19,3%) y glomerulonefritis segmentaria y focal o mesangial en 7 (22,5%).

Las correlaciones clínicas de los anticuerpos anti-ENA definidos mediante immunoblotting fueron las siguientes:

1.- Anticuerpos anti-RNP (anti-70 Kd y/o anti-A y/o anti-C).

Los anticuerpos anti-RNP se asociaron significativamente con una mayor incidencia de artritis, nódulos subcutáneos, edema en manos, fenómeno de Raynaud e hipergammaglobulinemia. Estos pacientes tenían con menor frecuencia proteinuria e insuficiencia renal (tabla 22). Presentaron niveles significativamente mayores de anticuerpos anti-ADN nativo (192,2 vs 99,5;  $t=1,69$ ;  $F=2,75$ ;  $p<0.005$ ). En particular los anticuerpos anti-70 Kd asociaban una mayor incidencia de linfopenia (OR=3,3) y esclerodactilia (OR=21,5), los anticuerpos anti-A un aumento de esclerodactilia (OR=16) y leucopenia (OR=3,3), y los anticuerpos anti-C una mayor frecuencia de nódulos subcutáneos (OR=4). Los valores más elevados de anticuerpos anti-ADN nativo aparecieron en los pacientes con anticuerpos anti-C (272,5 vs 87,6;  $t=2,19$ ;  $F=4,78$ ;  $p<0.005$ ). Los tres subgrupos de anticuerpos se asociaron con la presencia de anticuerpos anti-BB' y anti-D, especialmente los anticuerpos anti-C (OR=14 y 6,1 respectivamente).

2.-Anticuerpos anti-Sm (anti-BB' y/o anti-D).

Los pacientes con anticuerpos anti-BB' tuvieron con mayor frecuencia vasculitis, fenómeno de Raynaud y anticuerpos anti-RNP (tabla 23). Los pacientes con anticuerpos anti-BB' presentaban más vasculitis (OR=3,7), fenómeno de Raynaud (OR=2,6) y trombosis arteriales o venosas (OR=6,7). Tenían mayores niveles de anticuerpos

anti-ADN nativo (214,8 vs 91,7;  $t=1,84$ ;  $F=3,46$ ;  $p<0,005$ ) y cifras menores de C4 (8,25 vs 10,22;  $t=2,4$ ;  $F=2,58$ ;  $p<0,005$ ). Sorprendentemente la presencia de anticuerpos anti-BB' no se asociaba con los anticuerpos anti-Sm definidos mediante contraelectroforesis, pero existía asociación con los anticuerpos anti-70 Kd (OR=5,7), anti-A (OR=4,2), anti-C (OR=14) y anti-D (OR=19,4). El subgrupo de lupus eritematoso sistémico con anticuerpos anti-BB' presentó un aumento significativo de anticuerpos anti-Ro 52Kd y 60Kd (41,9% vs 13,1%;  $\chi^2=9,1$ ; OR=4,7;  $p<0,005$ ).

Los anticuerpos anti-D se asociaron con una mayor frecuencia de artritis (OR=5,4), edema en manos (OR=4,9) y fenómeno de Raynaud (OR=3,6). En estos pacientes se observó una mayor incidencia de anticuerpos dirigidos contra el resto de los polipéptidos RNP/Sm y contra el antígeno Ro (OR=4,2).

### 3.-Anticuerpos anti-La.

Los anticuerpos anti-La se asociaron con un aumento significativo de fotosensibilidad y factor reumatoide positivo (tabla 24). Estos pacientes presentaron títulos altos de factor reumatoide (147,1 vs 61,2;  $t=2,33$ ;  $p<0,05$ ) y niveles bajos de anticuerpos anti-ADN nativo (34,6 vs 141,7;  $t=3,74$ ;  $F=106,46$ ;  $p<0,005$ ).

#### 4.-Anticuerpos anti-Ro.

Los pacientes con anticuerpos anti-Ro definidos mediante immunoblotting presentaron con mayor frecuencia anticuerpos anti-D (OR=4,2), anticuerpos anti-La (OR=61) y factor reumatoide (OR=6,5) con niveles elevados (129,2 vs 47,4;  $t=2,81$ ;  $p<0,01$ ). Los anticuerpos anti-Ro 52Kd se asociaron con fotosensibilidad (OR=3,8). Los pacientes con anticuerpos anti-Ro y anti-La desarrollaron con menor frecuencia nefropatía (10%) que los pacientes con anticuerpos anti-Ro sin anticuerpos anti-La (50%) ( $\chi^2=4,9$ ; OR=2,9;  $p<0,005$ ). Los anticuerpos anti-Ro definidos mediante contrainmunolectroforesis se asociaron con fotosensibilidad y presentaban una baja incidencia de vasculitis, afección neurológica y proteinuria (tabla 25).

El 26% de los 15 pacientes diagnosticados de lupus eritematoso crónico discoide presentó anticuerpos anti-ENA. En 3 casos (20%) fueron anticuerpos anti-44Kd y solo en uno (6%) anticuerpos anti-Ro 52Kd y anti-La. Dos de los cinco pacientes con lupus eritematoso cutáneo subagudo presentaron anticuerpos anti-La, otro anticuerpos anti-Ro 60Kd y anti-La y otro anticuerpos anti-Ro 60Kd. Los cinco tenían anticuerpos anti-Ro nativo detectados mediante contrainmunolectroforesis y ELISA. Ninguno cumplía criterios de lupus eritematoso sistémico, aunque un paciente tuvo trombopenia y otro leucopenia. Tres presentaban lesiones eritematosas anulares, otro lesiones psoriasiformes y el quinto ambas simultáneamente.

En dos recién nacidos con lupus neonatal se

detectaron anticuerpos anti-Ro 52Kd y anti-La. En el tercero, con anticuerpos anti-Ro demostrados mediante contraelectroforesis y ELISA, el immunoblotting fue negativo. Los mismos anticuerpos fueron detectados en sueros de sus madres, dos portadoras de lupus eritematoso sistémico y otra sana. Dos de los niños tenían exclusivamente lesiones cutáneas eritematosas y el tercero requirió marcapasos por bloqueo aurículoventricular completo. En 8 niños de más de 2 años de edad con bloqueos cardíacos congénitos solo se detectaron anticuerpos anti-44Kd y anti-58Kd en uno y anticuerpos anti-44Kd en otro.

#### **7.- Anticuerpos anti-ENA en la esclerodermia y fenómeno de Raynaud primario.**

El immunoblotting demostró anticuerpos anti-ENA en el suero de 19 de los 28 pacientes estudiados (68%). Se detectaron:

--Anticuerpos anti-Scl 70 en 10 (35,7%).

--Anticuerpos anti-RNP en 6 (21,4%): anti-70Kd en 6, anti-A en 6 y anti-C en 2. Cinco cumplían criterios de enfermedad mixta del tejido conectivo al inicio de su enfermedad.

--Anticuerpos anti-BB' en uno de los pacientes con enfermedad mixta del tejido conectivo y anticuerpos anti-RNP.

--Anticuerpos anti-La en 1 (3,5%), anti-58Kd en 3 (10,7%) y anti-44Kd en 7 (25%).

--Anticuerpos anti-Ro en 2 (7,1%): anti-Ro 52Kd y anti-Ro 60Kd respectivamente.

En 23 pacientes, todas mujeres, pudo completarse el protocolo clínico. Los principales hallazgos se resumen en la tabla 26. La edad media era de 53 años y el tiempo medio de evolución de 12 años. En 16 (69,5%) se detectaron AAN con patrón moteado (8 casos), mixto (4 casos), homogéneo (3 casos) o nucleolar (3 casos). Solo en un paciente se identificaron anticuerpos anticentrómero. Los niveles de C3, C4 y anticuerpos anti-ADN nativo fueron normales y 5 pacientes presentaron factor reumatoide debilmente positivo.

Los anticuerpos anti-Scl 70 definidos mediante immunoblotting o contrainmunolectroforesis se asociaron con esclerosis cutánea difusa, enfermedad intersticial pulmonar y AAN positivo (tabla 27). Los 6 pacientes con anticuerpos anti-RNP presentaron con frecuencia artritis (66% vs 41%; OR=2,8;  $p<0,025$ ) y una baja incidencia de nefropatía (16% vs 76%; OR=0,6;  $p<0,005$ ).

En 9 de los 23 pacientes con fenómeno de Raynaud primario se encontraron anticuerpos anti-ENA: anticuerpos anti-Scl 70 en 2 (8,6%), anticuerpos anti-44Kd en 6 (26%) (uno de ellos con anticuerpos anti-58Kd) y anticuerpos anti-Ro 60Kd en el noveno. Uno de los pacientes con anticuerpos anti-Scl 70 presentaba artralgiyas, telangiectasias, livedo reticularis y AAN con patrón homogéneo anular. En ninguno de los dos existía esclerosis cutánea.

### **8.- Anticuerpos anti-ENA en pacientes con polimiositis.**

Se detectaron anticuerpos anti-Jo 1 en 2 de los 9 pacientes diagnosticados de polimiositis (22%), uno de ellos con anticuerpos anti-44Kd. Uno de los pacientes presentaba síndrome de Sjögren asociado y anticuerpos anti-Ro 60Kd y anti-La. Los 8 pacientes en los que se completó el protocolo clínico presentaron elevación de enzimas musculares y hepáticos en suero, patrón miopático en el electromiograma y biopsia compatible con miositis. Siete referían debilidad muscular, uno con mialgias intensas. Dos tenían heliótropo y pápulas de Gottron típicas, 3 esclerodactilia, 3 fenómeno de Raynaud y 3 artritis. En 3 casos se objetivó enfermedad intersticial pulmonar y dos de ellos, ambos con rasgos esclerodermiformes, tenían anticuerpos anti-Jo 1.

### **9.-Anticuerpos anti-ENA en la enfermedad mixta del tejido conectivo.**

En este grupo se incluyeron 16 pacientes que cumplían los criterios de diagnóstico propuestos por Kasukawa y col (55). En 5 pacientes se observó evolución a esclerodermia, 4 desarrollaron lupus eritematoso sistémico (dos de ellos tenían rasgos esclerodermiformes prominentes) y en otro caso el proceso predominante al final del estudio era la polimiositis. Todos presentaron anticuerpos anti-ENA: --Anticuerpos anti-RNP en todos los casos: anti-70Kd y anti-A en 14 (87,5%) y anti-C en 7 (43,7%).

--Anticuerpos anti-Sm en 3 (18,7%): anti-BB' en 3 y anti-D en uno. Los 3 pacientes con anticuerpos anti-BB' desarrollaron lupus eritematoso sistémico (2 casos) o esclerodermia y el paciente con anticuerpos anti-D evolucionó a lupus eritematoso sistémico.

--Anticuerpos anti-La en un paciente que desarrolló esclerodermia y anticuerpos anti-Ro 52Kd, anti-Ro 60Kd y anti-La en otro con evolución a lupus eritematoso sistémico.

--Anticuerpos anti-58Kd en 6 (37,5%) y anti-44Kd en 3 (18,7%).

Los hallazgos clínicos en estos pacientes se resumen en las tablas 28 y 29.

#### 10.-Anticuerpos anti-ENA en el síndrome de Sjögren primario.

El inmunoblotting fue positivo en 13 de los 21 pacientes con síndrome de Sjögren primario (62%). Se identificaron anticuerpos anti-La en 9 (42,8%), anticuerpos anti-58Kd en 5 (23,8%) y anticuerpos anti-44Kd en 1 (4,7%). En 9 (42,8%) aparecieron anticuerpos anti-Ro, todos dirigidos contra Ro 52Kd. Un paciente presentó además anticuerpos anti-Ro 60Kd y anti-La. La conrainmunolectroforesis demostró anticuerpos anti-Ro en 12 (57,1%). Los hallazgos clínicos se resumen en la tabla 30. Los anticuerpos anti-Ro eran más frecuentes en presencia de afección neurológica (OR=10) y factor reumatoide (OR=4).

En 78 pacientes existía un síndrome de Sjögren secundario. Las enfermedades asociadas eran artritis reumatoide en 63 (80,7%), lupus eritematoso sistémico en 6, esclerodermia en 6, polimiositis en 2 y lupus eritematoso cutáneo subagudo en uno. El inmunoblotting detectó anticuerpos anti-Ro en 15 casos (19,2%), dirigidos contra Ro 52Kd en 7 (8,9%) y contra Ro 60Kd en 11 (14%). No se detectaron anticuerpos anti-ENA en 11 pacientes con xeroftalmía aislada por queratoconjuntivitis sicca.

#### 11.-Anticuerpos anti-ENA en la artritis reumatoide.

En los 154 pacientes con artritis reumatoide estudiados mediante inmunoblotting con extracto de timo se detectaron los siguientes anticuerpos anti-ENA:

--Anticuerpos anti-RNP en 2 (1,2%), ambos anti-C.

--Anticuerpos anti-Sm en 2 (1,2%), ambos anti-BB'.

--Anticuerpos anti-La en 6 (3,8%), anticuerpos anti-58Kd en 24 (15,5%) y anticuerpos anti-44Kd en 29 (18,8%).

En 115 casos (74,6%) no se detectó ninguno de los anticuerpos.

En los 325 pacientes con artritis reumatoide estudiados mediante inmunoblotting con extracto de placenta se identificaron:

--Anticuerpos anti-Ro en 29 (8,9%): anti-Ro 52Kd en 9 (2,7%) y anti-Ro 60Kd en 26 (8%). Se detectaron anticuerpos anti-Ro 52Kd sin anti-Ro 60Kd en 3 (0,9%), anticuerpos anti-Ro 60Kd sin anti-Ro 52Kd en 20 (6,1%) y ambos en 6 (1,8%).

--Anticuerpos anti-La en 9 (2,7%), sin diferencias en cuanto a la presencia de anti-Ro.

--Anticuerpos anti-48Kd de placenta en 103 pacientes (31,6%).

En 202 casos (62%) no se detectó ningún anticuerpo anti-ENA con este extracto.

El protocolo clínico fue completado en 275 pacientes, 209 (76%) de sexo femenino. La edad media era de 57 años (22-84 años) y el tiempo medio de evolución 8,7 años (0,25-39 años). Los principales hallazgos se resumen en la tabla 31. Los anticuerpos anti-Ro se asociaron significativamente con una mayor incidencia de síndrome de Sjögren (45% vs 20%;  $\chi^2=6,8$ ; OR=3,1;  $p<0,01$ ) y niveles altos de factor reumatoide (301,3 vs 102,3;  $F=27$ ;  $p<0,005$ ). No se encontró correlación entre anticuerpos anti-Ro y anticuerpos anti-48Kd de placenta.

#### **12.-Anticuerpos anti-ENA en otras enfermedades.**

En 18 pacientes el diagnóstico fue conectivopatía no definida. Se detectaron anticuerpos anti-BB' y anti-D en un paciente, anticuerpos anti-58Kd en 4 (22%), anticuerpos anti-44Kd en uno y anticuerpos anti-La en otro. En 3 casos (16%) se encontraron anticuerpos anti-Ro, en 2 anti-Ro 60Kd y en uno anti-Ro 52 Kd. Once no presentaron ningún anticuerpo anti-ENA. Los hallazgos clínicos se resumen en la tabla 32. En todos se detectaron anticuerpos, generalmente AAN o factor reumatoide. El paciente con anticuerpos anti-Ro 52Kd refería artralgias y úlceras

orales, y el paciente con anticuerpos anti-Ro 60Kd presentaba pancitopenia persistente no relacionada con fármacos, neoplasias o infecciones. El tercer paciente, en el que se objetivaron anticuerpos anti-Ro 60Kd, anti-La, anti-BB' y anti-D, cumplía tres criterios de lupus eritematoso sistémico (artritis no erosiva, AAN y anticuerpos anti-ADN nativo elevados). En un paciente diagnosticado de artritis psoriásica se demostró la existencia de anticuerpos anti-Ro mediante contrainmunolectroforesis y ELISA. Los anticuerpos reconocían el antígeno Ro 60Kd en immunoblotting. En tres pacientes, 1 granulomatosis de Wegener, 1 condrocalcinosis y 1 glomerulonefritis idiopática, se detectaron anticuerpos anti-58Kd. Otros tres pacientes tenían anticuerpos anti-44Kd y presentaban poliarteritis nodosa, vasculitis aislada del sistema nervioso central y tiroiditis autoinmune respectivamente. No se detectaron anticuerpos anti-ENA en pacientes diagnosticados de síndrome de Reiter, espondilitis anquilosante o polimialgia reumática, ni en el resto de enfermedades incluidas en las tablas 2 y 3.

## DISCUSION

Las células de los mamíferos contienen un gran número de moléculas de ARN. Las principales son el ARN ribosómico, el ARN de transferencia (t-RNA), el ARN mensajero, el ARN heteronuclear (hnRNA) y los diferentes ARN de pequeño tamaño llamados "small RNAs" (sRNAs). Estos últimos pueden localizarse en el núcleo (snRNAs) o en el citoplasma (scRNAs) (60). En todos los casos estudiados estos ARN aparecen unidos por enlaces no covalentes a diferentes proteínas, formando complejos ribonucleoproteicos nucleares (snRNPs) o citoplasmáticos (scRNPs). En general son partículas muy conservadas y poco inmunógenas aunque, paradójicamente, algunas son reconocidas por anticuerpos séricos de pacientes con lupus eritematoso sistémico u otras conectivopatías (3). Estas proteínas suelen extraerse de los tejidos con soluciones salinas de baja fuerza iónica por lo que inicialmente se denominaron ENA (extractable nuclear antigen). Algunos ENA, como el antígeno Scl-70, no están asociados a ARN.

Los anticuerpos capaces de reaccionar con ENA se conocen desde los trabajos de Anderson (61) y Holman (62). Se observó que sueros de pacientes con enfermedades reumáticas sistémicas formaban líneas de precipitación al enfrentarse en inmunodifusión con extractos salinos de tejidos humanos. En 1966, Tan y Kunkel (18) demostraron la existencia de anticuerpos en sueros de pacientes con lupus eritematoso sistémico dirigidos contra un extracto de timo y los llamaron anticuerpos anti-Sm (Smith). En 1971

Mattioli y Reichlin (19) detectaron anticuerpos que reaccionaban con un antígeno sensible a ribonucleasa y tripsina, al que llamaron Mo. Simultáneamente Sharp y col (1) definieron la enfermedad mixta del tejido conectivo en base a la detección de anticuerpos que reaccionaban con una ribonucleoproteína o anticuerpos anti-RNP. El antígeno Mo y el antígeno RNP eran idénticos (63). Mediante pruebas enzimáticas se diferenciaron dos antígenos, uno resistente a ribonucleasa y tripsina (Sm) y otro sensible a dichas enzimas (RNP) (1,63,64). Desde los primeros estudios se sugirió que los anticuerpos anti-Sm y anti-RNP estaban relacionados, dado que con frecuencia aparecían en los mismos sueros (19,20,64).

Lerner y Steitz (3) utilizaron la capacidad de unión a anticuerpos de la proteína A estafilocócica para purificar complejos formados al enfrentar sueros de paciente con lupus eritematoso sistémico y extractos de células HeLa marcados con P32. Demostraron que los anticuerpos anti-RNP y anti-Sm precipitaban selectivamente partículas snRNP formadas por ARN rico en uridina (U-RNAs) y proteínas nucleares no histonas muy conservadas en las que residía la antigenicidad. Posteriormente se ha confirmado que los anticuerpos anti-RNP precipitan la partícula U1-snRNP (65,66) ó, en algunos casos, las partículas U1 y U2-snRNPs (67). En immunoblotting los anticuerpos anti-RNP reaccionan con un polipéptido de la matriz nuclear de peso molecular 70Kd (ó 68Kd) y con otros dos polipéptidos asociados a U1-RNA cuyos pesos

moleculares son 33Kd (A) y 22Kd (C) (3,13,21,68,69). Los anticuerpos anti-Sm precipitan cinco ARN (U1, U2, U4, U5 y U6) y en immunoblotting reaccionan con los polipéptidos BB' (28-29Kd) y D (14Kd) (3,4,68-70). Si se eluyen anticuerpos anti-70Kd, anti-A y anti-C separadamente, todos precipitan de forma exclusiva U1-snRNP y si se eluyen anticuerpos anti-BB' precipitan U1-6RNPs y reaccionan cruzadamente con el péptido D (77). El hecho de que los anticuerpos anti-Sm precipiten pequeñas cantidades de U1-RNP sugiere la asociación molecular de los antígenos Sm y RNP. Los anticuerpos anti-Sm pueden reconocer dos fracciones diferentes del antígeno, una libre y otra unida a RNP (68,72,73). Es posible que la mayoría de los sueros con reactividad anti-RNP posean títulos bajos de anticuerpos anti-Sm (13), aunque pueden identificarse sueros monoespecíficos anti-RNP (72).

En 1968 Clark y col (22) comunicaron la existencia de anticuerpos dirigidos contra un antígeno citoplasmático de bazo humano al que denominaron Ro. El antígeno fue definido como resistente a ribonucleasa y tripsina. Poco después Mattioli y Reichlin (23) encontraron que algunos sueros de pacientes con lupus eritematoso sistémico precipitaban al enfrentarse con extractos de timo y de bazo. El antígeno implicado, llamado La, era soluble y muy susceptible a la degradación proteolítica. Se obtenía de la fracción citoplasmática. Simultáneamente Alspaugh y col (24,25) comunicaron que sueros de pacientes con síndrome de Sjögren reaccionaban en inmunodifusión con antígenos

presentes en extractos salinos de células WiL-2. Estos anticuerpos, denominados anti-SSA y anti-SSB, producían un patrón de inmunofluorescencia nuclear sobre células WiL-2 o células de bazo humano. La susceptibilidad al tratamiento enzimático era diferente. El antígeno SS-B era sensible a tripsina y el antígeno SS-A era resistente. Las diferencias dependían de los tejidos utilizados en la extracción. Inicialmente se consideró que el antígeno Ro era ciplasmático pues los anticuerpos anti-Ro producían un patrón de inmunofluorescencia citoplasmático sobre cortes congelados de bazo humano (74,75). Sobre células WiL-2 u otras células el patrón era nuclear (25,76,77).

La precipitación obtenida al enfrentar anticuerpos anti-Ro y anti-La con extractos celulares ha permitido demostrar que los antígenos están asociados a ARN (4,28,29), es decir, son ribonucleoproteínas. La reactividad de los anticuerpos depende de la fracción proteica. Los anticuerpos anti-La precipitan snRNAs de origen humano y viral (4,78-86). En immunoblotting reconocen varios polipéptidos, dependiendo del grado de degradación del extracto. En general se acepta que el antígeno La tiene un peso molecular entre 45 y 50 Kd (87) con varios productos de degradación. Algunos anticuerpos anti-La reconocen epítopes conformacionales (88). Los anticuerpos anti-Ro precipitan varios ARN citoplasmáticos humanos (hYRNA) (28,29,78,79,89,90). Reaccionan preferentemente con antígeno Ro humano, un antígeno que está poco conservado (91). En un principio se consideró

que correspondía en inmunoblotting a un polipéptido de 60Kd (29,30,34,35,92,93), ahora se sabe que existen al menos cuatro isoformas del antígeno Ro desnaturalizado reconocidas por los anticuerpos anti-Ro humanos. Rader y col (32) encontraron que el antígeno Ro de linfocitos era diferente al de los hematíes. En el primer caso los anticuerpos anti-Ro reaccionaban con proteínas de 52 y 60Kd, en el segundo con proteínas de 54 y 60Kd (94). Los anticuerpos anti-Ro60Kd de linfocitos y hematíes tienden a aparecer juntos y reaccionan cruzadamente entre sí. Lo mismo ocurre con los anticuerpos anti-Ro 52 y 54Kd (95). El antígeno Ro de los hematíes humanos comparte identidades con el antígeno Ro bovino, pero sus propiedades moleculares son diferentes (96). Ben-Chetrit y col (33) demostraron que los anticuerpos anti-Ro reaccionan con dos polipéptidos, de peso molecular 52 y 60Kd, antigénica y estructuralmente diferentes. Ambos se unen de forma no covalente a snRNAs y hY1-hY5, pero no existe reacción cruzada entre ellos y el patrón de degradación enzimática es diferente (33,97). Los anticuerpos anti-Ro60Kd reaccionan de forma predominante contra la proteína Ro 60Kd nativa y los anticuerpos anti-Ro52Kd reconocen únicamente epítopes desnaturalizados (98,99), aunque reaccionan cruzadamente con la proteína Ro 60Kd nativa. De hecho, todos los sueros anti-Ro52Kd presentan anticuerpos anti-Ro60Kd nativo (98). Recientemente se ha comunicado que los anticuerpos anti-Ro reaccionan con una proteína de 46Kd de células WiL-2

identificada como la calregulina, equivalente al polipéptido Ro60Kd. La diferencia en el peso molecular se debería a una migración aberrante en la electroforesis según estos autores (100,101).

Los estudios de inmunodifusión y contrainmunolectroforesis muestran que con frecuencia los anticuerpos anti-Ro y anti-La coexisten en los mismos sueros (23,102) y se ha comprobado que la mayoría de los sueros anti-La contienen actividad anti-Ro (8,103). Es posible que ambos antígenos coexistan en un mismo complejo (7,29,104), de hecho las partículas Ro-scrNPs precipitan con anticuerpos anti-Ro y con anticuerpos anti-La (28,84,90,105) y una fracción del antígeno Ro nativo comigra con el antígeno La en geles nativos (14). Los anticuerpos anti-Ro52Kd precipitan Ro52Kd y Ro60Kd por lo que ambos polipéptidos formarían un complejo en estado nativo (14,33).

Reichlin y Mattioli (106) identificaron reacciones de precipitación en inmunodifusión al enfrentar sueros de pacientes con polimiositis y extractos de timo de ternera. Las reacciones desaparecían tras el tratamiento con tripsina. El precipitado era muy heterogéneo e incluía al menos nueve especificidades (107), especialmente enzimas aminoacil-tRNAsintetasas. La principal es la reconocida por los anticuerpos anti-Jo1, situada en el núcleo o en el citoplasma según la fase del ciclo celular (7). Mediante immunoblotting los anticuerpos anti-Jo1 reconocen un polipéptido de 50Kd identificado como la enzima histidil-

tRNA sintetasa (44,108,109). Pueden detectarse anticuerpos anti-Jol nativo (109).

Los anticuerpos anti-Scl 70 fueron identificados por Tan y col (110) en sueros de pacientes con esclerodermia. Este antígeno y otros, como el Scl-86, son productos de degradación de la enzima ADN-topoisomerasa I (42,111-113), cuyo peso molecular es 100 Kd. El antígeno se sitúa preferentemente en las regiones centroméricas de los cromosomas de células de ratón en fase G2. Es una proteína muy sensible a proteasas y a la interacción iónica con diferentes soluciones salinas (114) lo que explica los pesos moleculares obtenidos en las distintas extracciones.

La mayoría de los anticuerpos anti-ENA, en especial los mencionados, se detectan mediante técnicas de precipitación en geles de agarosa, inmunodifusión ó conrainmunolectroforesis. Los antígenos se extraen de timo animal y placenta o bazo humanos. La reacción de precipitación se produce cuando el antígeno y el anticuerpo difunden en la agarosa y forman complejos insolubles. Son técnicas sencillas, rápidas y económicas (5), pero su sensibilidad es baja y es difícil identificar varios anticuerpos en un mismo suero (7,115). En los últimos años se han desarrollado técnicas más sensibles, como el ELISA o el immunoblotting, capaces de identificar las diferentes poblaciones de anticuerpos anti-ENA. El ELISA es muy sensible. Es menos específico que la inmunodifusión o la conrainmunolectroforesis (8) y requiere una purificación rigurosa de cada uno de los

antígenos. El immunoblotting es más sensible que la inmunodifusión y la contraimmunoelectroforesis (42,69,116) y permite detectar simultáneamente diferentes anticuerpos sin purificar cada uno de los antígenos (12,46).

#### **Detección de anticuerpos anti-ENA mediante immunoblotting**

Existen diferentes técnicas de "blotting". Southern (117) inmovilizó fragmentos de ADN en geles de agarosa y los transfirió pasivamente a un papel de nitrocelulosa. A esta técnica se le denominó "Southern-blot". Alvine y col (118) la modificaron a fin de poder transferir fragmentos no fijados y por oposición a la anterior la llamaron "Northern-blot". Burnette (11) transfirió a papel de nitrocelulosa las proteínas separadas en geles de poliacrilamida con SDS. La técnica de Burnette, denominada "western-blot" o immunoblotting, se diferencia de las anteriores en que utiliza detergentes aniónicos (SDS), geles de poliacrilamida y glicina. Combina la electroforesis de Laemmli (9) y la transferencia en campo eléctrico descrita por Towbin y col (10). La electroforesis separa las proteínas por su capacidad para moverse en un campo eléctrico (119,120) y la transferencia permite su identificación. Conocidos los antígenos separados y transferidos pueden detectarse anticuerpos séricos. Una vez adheridos los antígenos al papel se incubaba con suero del paciente y tras varios lavados se añade una antiinmunoglobulina marcada enzimáticamente. Al

mezclar el cromógeno y el substrato enzimático adecuados se visualiza la reacción.

Los geles de poliacrilamida se forman por la polimerización de monómeros de acrilamida y bisacrilamida. Son geles porosos en los que el diámetro del poro depende de la concentración de monómeros, según la fórmula:

$$\% T = \frac{\text{acrilamida (gr)} + \text{bisacrilamida (gr)}}{\text{volumen total}} \times 100$$

Al aumentar el % T del gel se disminuye el diámetro de los poros y se reduce la velocidad de migración de las proteínas, lo que permite modular su recorrido variando la concentración de monómeros en el gel para un mismo tiempo de electroforesis. Los geles de Laemmli (9) son geles multizona, con un primer gel concentrador (pH=6,8) y un segundo gel separador (pH=8,8) en una solución de glicina-cloruro (pH=8,3). En el primer gel se mantiene un % T bajo (5%) e invariable, con lo que el poro es ancho y las proteínas se concentran. El segundo gel tiene un % T más alto, entre 7,5 y 30%, que permite la separación de las proteínas. Si se usa un % T inadecuado en el segundo gel algunas proteínas se pierden al no penetrar en el gel y otras no se separan. Existe un % T óptimo para separar cada par de proteínas, pero no hay un % T que permita la separación máxima de todas las proteínas presentes en una mezcla compleja. Por tanto debe escogerse un % T capaz de separar las proteínas objeto de cada estudio (121) o bien utilizar un gradiente de concentración en el gel. Con un T

15% en el segundo gel pueden separarse proteínas entre 10 y 100Kd. Las inferiores apenas se diferencian en el frente de electroforesis y las superiores no entran en el gel.

La electroforesis en geles de poliacrilamida permite calcular el peso molecular de las proteínas separadas por comparación con la movilidad electroforética de una serie de proteínas de peso molecular conocido (122). Las proteínas se disgregan en cadenas lineales por efecto del SDS, agente disociador que rompe los enlaces hidrógeno, y del beta-mercaptoetanol, agente reductor que rompe los enlaces disulfido. La longitud de la cadena proteica es proporcional a su peso molecular. Los epítopes reactivos con los anticuerpos anti-ENA no se destruyen por la acción de dichos agentes.

La utilización de geles 18% permite separar correctamente los antígenos ENA objeto del estudio y calcular sus pesos moleculares aproximados tras el immunoblotting. La aplicación de 800-1000 µg de extracto en cada placa no sobrecarga el gel y la electroforesis es correcta. El papel de nitrocelulosa adhiere proteínas de peso molecular entre 10 y 100Kd y, aunque pueden perderse proteínas inferiores a 20Kd (123), siempre se detecta el polipéptido D (14Kd) al incubar con sueros anti-Sm positivos.

Los principales inconvenientes del immunoblotting son la reproductibilidad y la interpretación de los resultados. Pequeñas variaciones en la eficacia de la transferencia al papel de nitrocelulosa y la acción de los

detergentes en los lavados pueden alterar la reproductibilidad (124). Estos detergentes son indispensables para evitar reacciones inespecíficas, pero pueden eluir las proteínas adheridas al papel (123-126). En las condiciones habituales poco más de un 10% de las proteínas aplicadas en el gel aparecen finalmente en el papel (124), probablemente porque el detergente reduce la interacción hidrofóbica por la que se adhieren las proteínas (127). El Tween-20 no altera la detección de anticuerpos en el estudio y, además de evitar reacciones inespecíficas, podría tener un efecto renaturalizante que mejora el reconocimiento de los antígenos (124,128,129).

Una vez comprobada la presencia de una cantidad suficiente de cada antígeno adherida al papel de nitrocelulosa y su detección por anticuerpos específicos, la reproductibilidad depende en gran parte de la dilución del suero y de las condiciones de los lavados (130). Con la metodología aplicada en este y en otros estudios (6,12,15) el immunoblotting es una técnica reproducible y útil en el estudio de anticuerpos en grupos amplios de pacientes. El antígeno es fácil de obtener, no es indispensable utilizar células mantenidas en cultivo y no se requieren protocolos sofisticados de purificación. La alta concentración de antígenos minimiza la pérdida durante la transferencia y como en otros estudios (131), la baja dilución de los sueros no aumenta las reacciones inespecíficas. La lectura es sencilla si se colocan sueros de referencia positivos en cada papel de nitrocelulosa y

para cada anticuerpo. Estos controles permiten además verificar la efectividad de la transferencia. Las reacciones positivas son específicas. Cuando los anticuerpos eluidos se enfrentan separadamente reconocen el antígeno del que han sido eluidos. El inmunoblotting permite detectar simultáneamente varios anticuerpos presentes en un mismo suero, identificando los antígenos desnaturalizados específicos, sean solubles o insolubles (6,15).

#### **Patrones de anticuerpos anti-ENA definidos mediante inmunoblotting.**

Los patrones obtenidos mediante inmunoblotting pueden variar al cambiar el extracto antigénico (130), pero son constantes para cada extracto. Después de tres años los mismos sueros de referencia positivos siguen mostrando idénticas reacciones. Los patrones de inmunoblotting son únicos para cada paciente con anticuerpos, aunque no siempre son estables pudiendo aparecer y desaparecer anticuerpos en función de la actividad de la enfermedad o del tratamiento (132). La identidad de un determinado anticuerpo en el blot se establece analizando la distancia recorrida por el polipéptido (o su peso molecular) y comparándola con el patrón positivo. En teoría con esta sistema puede ser difícil asegurar la especificidad del anticuerpo, en particular si existen anticuerpos dirigidos contra proteínas de peso molecular similar (133). En la práctica no hay problemas para

identificar la mayoría de las reacciones. En los pocos casos dudosos los anticuerpos eluidos y la variación del  $R_f$  T del gel han permitido confirmar la identidad de los anticuerpos. En la mayor parte de estos sueros el ELISA también ha demostrado la presencia de los anticuerpos.

El extracto de timo de conejo obtenido con ClNa 350 mM es útil para detectar anticuerpos anti-Sm, Anti-RNP, anti-Jo 1, anti-Scl70 y anti-La. Los anticuerpos anti-Ro pueden identificarse con placenta humana extraída con ClNa 300 mM. Las discordancias en el peso molecular de los polipéptidos reconocidos pueden deberse a diferencias en las técnicas y en los extractos utilizados. En todos los casos los patrones obtenidos corresponden a lo descrito en la mayoría de los estudios (3,13,15,16,21,33,35,42,87,134,135). Los anticuerpos anti-Scl 70 reconocen un polipéptido de 100Kd y varios productos de degradación. En antígeno Jo 1 es reconocido en immunoblotting como un péptido de 46Kd y los anticuerpos anti-La reaccionan contra otros tres de 45, 37 y 35Kd. Los sueros anti-Ro reconocen polipéptidos de 60 y/o 52Kd. Los anticuerpos anti-RNP reaccionan con varias combinaciones de los péptidos 70Kd, A y C, y los anticuerpos anti-Sm con BB' y/o D. Los antígenos B y B' son idénticos salvo por la adición de 10 aminoácidos en el terminal C de B' (136).

Se han comunicado reacciones cruzadas entre los anticuerpos o epítopes compartidos sobre BB' y D (71,116,134,137), A y BB' (128,137), A y C (136,138,139),

C y BB' (140) ó 70, A y C (13,131). Un pequeño porcentaje de sueros con anticuerpos anti-70Kd reconoce también BB' (134,141), aunque generalmente los títulos son bajos (69,71). Sueros anti-RNP sin anticuerpos anti-70Kd también reaccionan con BB' (141). Sueros que reconocen el antígeno Sm libre presentan anticuerpos anti-70Kd y anti-D. Parecen existir diferencias entre los anticuerpos anti-70KdRNP y un antígeno de mismo peso molecular asociado a Sm (137). Este polipéptido de 70Kd identificado en el antígeno Sm libre no reacciona con sueros anti-RNP (142,143), como lo hace el asociado a la matriz nuclear e implicado en la unión a U1-snRNP (A y C) (12,17).

Los sueros definidos como anti-RNP suelen contener pequeñas cantidades de anticuerpos anti-Sm cuando se estudian mediante precipitación inmune (144) y es posible que la mayoría de los sueros anti-RNP posean anti-Sm (13), aunque pueden aparecer sueros anti-RNP sin anti-Sm (72). Mediante precipitación inmune e immunoblotting rara vez se detectan anticuerpos anti-Sm puros (16,145) y parece deberse a la asociación física de los antígenos Sm y RNP. Posiblemente forman un complejo en estado nativo (68,146,147) y se acepta la existencia de tres respuestas: anti-RNP (anti-70Kd y/o anti-A y/o anti-C), anti-RNP/Sm (anti-70 Kd y/o anti-A y/o anti-C y anti-BB' y/o anti-D) y anti-Sm (anti-BB' y/o anti-D) (68,72,148-150).

El análisis de los anticuerpos anti-ENA definidos mediante immunoblotting muestra resultados similares a

los obtenidos en otros estudios. Los anticuerpos anti-Scl 70 y anti-Jo 1 son prácticamente específicos de esclerodermia y polimiositis respectivamente, aunque el número de pacientes es pequeño. La presencia de anticuerpos anti-Scl 70 en individuos con enfermedad de Raynaud primaria sugiere el desarrollo de esclerodermia (113,151,152).

Los diagnósticos más frecuentes en los pacientes con anticuerpos anti-RNP son el lupus eritematoso sistémico (68%) y la enfermedad mixta del tejido conectivo (26%), aunque la frecuencia puede variar según los criterios de diagnóstico y las técnicas utilizadas. El porcentaje de lupus eritematoso sistémico oscila entre 41% (131) y 51% (153) con inmunodifusión ó contraínmunoeléctroforesis. Es mayor, 88% en la serie de McHugh y col (154), cuando se utiliza el inmunoblotting. En otros estudios el número de pacientes con enfermedad mixta es mayor especialmente si se usa la hemaglutinación pasiva. Con dicha técnica Rasmussen y col (155) encontraron que el 43% de los 97 pacientes con anticuerpos anti-RNP estudiados presentaba enfermedad mixta del tejido conectivo y solo el 22% estaba diagnosticado de lupus eritematoso sistémico. Si se consideran solamente los anticuerpos anti-RNP sin anti-Sm el porcentaje de lupus eritematoso sistémico y enfermedad mixta del tejido conectivo es similar, 46 y 43% respectivamente. En los pacientes con anticuerpos anti-C es mayor el predominio de lupus eritematoso sistémico (75% de casos). Los anticuerpos anti-Sm definidos mediante

immunoblotting aparecen en pacientes con lupus eritematoso sistémico (92%). Los anticuerpos anti-BB' son más frecuentes que los anticuerpos anti-D, hecho ya observado previamente (116,156), pero solo los anticuerpos anti-D son realmente específicos de lupus eritematoso sistémico. Pueden detectarse anticuerpos anti-BB' en algunos casos de artritis reumatoide y en otras conectivopatías (116).

Los anticuerpos anti-La se detectan generalmente en lupus eritematoso sistémico (41%), síndrome de Sjögren primario (23%) y artritis reumatoide (17%). El principal diagnóstico en pacientes con anticuerpos anti-Ro es el lupus eritematoso sistémico, tanto en el caso de los anticuerpos anti-Ro 60Kd (53%) como en el caso de los anticuerpos anti-Ro 52Kd (58%). En el grupo con anticuerpos anti-Ro 60Kd el segundo diagnóstico es la artritis reumatoide (34%) y solo un 1% presenta síndrome de Sjögren primario. Entre los pacientes con anticuerpos anti-Ro 52Kd hay una frecuencia similar de artritis reumatoide y síndrome de sjögren (16%). Los sueros con reactividad simultánea anti-Ro 52Kd y 60Kd suelen corresponder a lupus eritematoso sistémico (79%) y artritis reumatoide (17%). Si se consideran los anticuerpos anti-Ro 60Kd sin anti-Ro 52Kd se observa una disminución del porcentaje de lupus eritematoso sistémico (31%) y un aumento de casos de artritis reumatoide, hasta el punto de ser el diagnóstico más frecuente en este subgrupo. Entre los pacientes con anticuerpos anti-Ro 52Kd sin anti-Ro 60Kd predominan el síndrome de Sjögren

primario (38%) y el lupus eritematoso sistémico (23%). La presencia de artritis reumatoide en series de pacientes con anticuerpos anti-Ro es significativa. Si se detectan mediante contraelectroforesis/inmunodifusión constituye un 9-12% de los casos (157,158). En la mayoría de las series el diagnóstico predominante es el lupus eritematoso sistémico y el porcentaje de casos con síndrome de Sjögren primario es bajo (6-9%), similar al de la artritis reumatoide (74,159). Si se analiza la presencia de anticuerpos anti-Ro en ausencia de otros anticuerpos séricos se observa un aumento de los diagnósticos de artritis reumatoide y conectivopatías no definidas (157,160) y ambas superan al lupus eritematoso sistémico.

Todos los pacientes con anticuerpos anti-La presentan simultáneamente anticuerpos anti-Ro, en general anti-Ro 52Kd (95). La asociación anti-Ro52Kd, anti-Ro60Kd y anti-La suele corresponder a lupus eritematoso sistémico (89%). Entre los paciente con anticuerpos anti-Ro 60Kd y anti-La predomina la artritis reumatoide y en el caso de los anticuerpos anti-Ro 52Kd y anti-La el síndrome de Sjögren primario y el lupus eritematoso sistémico.

#### **Comparación de las técnicas de**

#### **contraelectroforesis e inmunoblotting.**

El inmunoblotting es mucho más sensible que la contraelectroforesis en la detección de anticuerpos anti-La, anti-RNP y anti-Sm. Un 30% de los sueros anti-La,

un 51% de los anti-RNP y un 57% de los anti-Sm presentan contraimmunoelectroforesis negativa. No se detecta una mayor frecuencia de anticuerpos anti-Scl 70 probablemente por lo reducido de la serie y el elevado porcentaje de positivos en la contraimmunoelectroforesis.

En los sueros anti-RNP o anti-Sm la negatividad de la contraimmunoelectroforesis puede deberse a la mayor sensibilidad del immunoblotting (46,116), pero también a los polipéptidos reconocidos por cada suero. Así sueros anti-BB' sin anti-D son negativos en contraimmunoelectroforesis y se ha observado que la reacción anti-Sm en contraimmunoelectroforesis corresponde a anticuerpos anti-D (72). En la mayoría de los sueros anti-RNP la reacción en la contraimmunoelectroforesis es con el antígeno 70Kd-RNP (7) aunque en éste y en otros estudios pueden verse sueros anti-RNP que reaccionan exclusivamente con el péptido C (161). En los sueros definidos mediante contraimmunoelectroforesis como anti-RNP o anti-Sm el immunoblotting muestra una distribución de anticuerpos similar a la comunicada por Meyer y col (162). Rara vez aparecen anticuerpos anti-RNP nativo (163).

El immunoblotting es menos sensible que la contraimmunoelectroforesis en la detección de anticuerpos anti-Ro (164). Entre el 10% (14) y el 15% (30,33) de los sueros definidos como anti-Ro mediante inmunodifusión o contraimmunoelectroforesis no reaccionan en immunoblotting. En este estudio el porcentaje llega al

24%. Estos anticuerpos se han confirmado mediante ELISA y se deben, bien a la existencia de anticuerpos de baja afinidad (109), bien a que los anticuerpos reaccionan exclusivamente con el antígeno Ro nativo (14,165). Si se elimina del extracto el antígeno Ro 60Kd desnaturalizado todos los sueros anti-Ro mantienen reactividad contra el antígeno Ro nativo (14). Los sueros anti-Ro positivos en contrainmunolectroforesis e inmunoblotting presentan anticuerpos anti-Ro 52Kd (45%), anticuerpos anti-Ro 60Kd (28%) o ambos (27%). Los sueros anti-Ro positivo en inmunoblotting con contrainmunolectroforesis negativa presentan con mayor frecuencia anticuerpos anti-Ro 60Kd (73%). Algunos solo reaccionan en inmunoblotting siendo el ELISA o la precipitación en gel negativas, por lo que parece posible una respuesta anti-Ro dirigida exclusivamente contra epítopes desnaturalizados (166).

#### **Significado clínico de los anticuerpos anti-ENA detectados mediante inmunoblotting.**

La positividad de cada anticuerpo en una determinada enfermedad depende de la técnica de detección, de la población estudiada, de los criterios utilizados en el diagnóstico y de la evolución de los pacientes. La contrainmunolectroforesis muestra un bajo porcentaje de positivos en relación a otras series (17,167), pero coincide con lo descrito en poblaciones similares (168,169). La experiencia con el inmunoblotting es muy

limitada y los pocos estudios disponibles incluyen un número reducido de pacientes o se centran en un determinado anticuerpo.

#### 1.- Anticuerpos anti-Sm.

Los anticuerpos anti-Sm son marcadores de lupus eritematoso sistémico y se detectan mediante inmunodifusión o contraelectroforesis en un 25-40% de pacientes (148,170-173). Son menos frecuentes en caucásicos (6-15%) (168,169,174,175) que en pacientes asiáticos o de raza negra (10-30%) (176,178). El inmunoblotting aumenta el número de positivos por su mayor sensibilidad. En el presente estudio se detectan anticuerpos anti-Sm en el 33% de los pacientes con lupus eritematoso sistémico. Son anticuerpos anti-BB' en un 28% y anticuerpos anti-D en un 15% de los casos. Los pacientes que cumplían criterios de enfermedad mixta del tejido conectivo y presentaban anticuerpos anti-Sm desarrollaron lupus eritematoso sistémico.

Se han realizado numerosos estudios buscando una correlación entre la presencia de anticuerpos anti-Sm y unos determinados rasgos clínicos, pero no hay nada concluyente al respecto. Utilizando inmunodifusión ó contraelectroforesis se ha sugerido que los pacientes con anticuerpos anti-Sm presentan con mayor frecuencia fenómeno de Raynaud (179,180), vasculitis (181,183) y leucopenia (181,183). Se ha sugerido asociación entre anticuerpos anti-Sm y glomerulonefritis membranosa (184) o mayor riesgo de nefropatía severa

(153,171,185-189), probablemente por la mayor frecuencia de anticuerpos anti-ADN nativo en dichos pacientes. Otros estudios no encuentran relación entre los anticuerpos anti-Sm y la nefropatía lúpica severa (179,181,182,190-193). En pacientes con anticuerpos anti-Sm y títulos bajos de anticuerpos anti-ADN nativo hay un menor riesgo de nefropatía que en pacientes con anticuerpos anti-ADN nativo sin anticuerpos anti-Sm (170,179,180,183). Algo similar ocurre con la asociación entre anticuerpos anti-Sm y afección neurológica (182,185,191,194,195) que parece relacionarse con los anticuerpos anti-ADN nativo (179) y no se encuentra en todos los estudios (181,190).

El inmunoblotting muestra una mayor frecuencia de vasculitis y fenómeno de Raynaud en pacientes con anticuerpos anti-Sm, al igual que Ter Borg y col (196), pero la asociación es débil. Se ha sugerido un mayor riesgo de nefropatía y afección neurológica en pacientes con anticuerpos anti-BB' y anti-D (197,198) que no se confirma en este y en otros estudios (162). Los pacientes con anticuerpos anti-BB' presentan una mayor frecuencia de trombosis y mayores niveles de anticuerpos anti-ADN nativo. Los pacientes con anticuerpos anti-D presentan un aumento significativo de artritis.

## **2.- Anticuerpos anti-RNP.**

La presencia de títulos elevados de anticuerpos anti-RNP en ausencia de otros autoanticuerpos sugiere el diagnóstico de enfermedad mixta del tejido conectivo

(199), aunque esta situación puede darse en pacientes con lupus eritematoso sistémico, esclerodermia u otras conectivopatías (63,187,200-203). La enfermedad mixta del tejido conectivo se ha considerado como una entidad definida, diferente del lupus eritematoso sistémico, pero no hay unanimidad al respecto y algunos la consideran como un subgrupo de lupus eritematoso sistémico o esclerodermia (103,203,204).

Los anticuerpos anti-RNP se detectan mediante inmunodifusión, contraelectroforesis o hemaglutinación pasiva en el 95-100% de los pacientes con enfermedad mixta del tejido conectivo (1,5,172,187,205) y en el 30-45% de los pacientes con lupus eritematoso sistémico (63,148,176,187,196,201,206,207). Son más frecuentes en los enfermos de raza negra que en los de raza blanca (178). Pueden detectarse en un 10-20% de pacientes con esclerodermia difusa (5,169,205,208-210) o síndrome de Sjögren primario (5,21,205), en un 3-10% de pacientes con artritis reumatoide (5,187,212,213) y en casos aislados con fenómeno de Raynaud primario, conectivopatías no definidas u otros procesos (16,153). Los datos obtenidos con el immunoblotting son similares a los de otros estudios (12,13,15,131,137,154,214). Aparecen anticuerpos anti-RNP en todos los pacientes con enfermedad mixta del tejido conectivo, en el 33% en lupus eritematoso sistémico, en el 21% en esclerodermia y en menos del 3% en otros procesos. Hay un claro predominio de anticuerpos anti 70Kd y anti-A en los pacientes con enfermedad mixta

del tejido conectivo, como en las series de Habets y col (12) o Reichlin y Van Venrooij (215). Se ha sugerido que los anticuerpos anti-70Kd se asocian con enfermedad mixta del tejido conectivo y los anticuerpos anti-A y/o anti-C sin anti-70Kd con el lupus eritematoso sistémico u otras conectivopatías (6,12,15,13,69). La frecuencia de los anticuerpos en ambos procesos puede variar en función de la dilución del suero. En pacientes con lupus eritematoso sistémico Pettersson y col (13) encontraron anticuerpos anti-70Kd en un 7% de casos, diluyendo el suero 1:250. Habets y col (12), con una dilución 1:50, los detectaron en un 21% y Combe y col (131) en un 52% diluyendo el suero 1:5. A pesar de estas diferencias es evidente que los anticuerpos anti-70Kd y anti-A son constantes en la enfermedad mixta del tejido conectivo y mucho menos frecuentes en el lupus eritematoso sistémico. Los sueros de lupus eritematoso sistémico que reaccionan con el antígeno RNP suelen reconocer en immunoblotting menos polipéptidos que los sueros de pacientes con enfermedad mixta del tejido conectivo (131).

Los anticuerpos anti-RNP, en ausencia de anticuerpos anti-Sm, se asocian con una mayor frecuencia de artralgias, artritis, fenómeno de Raynaud, edema en el dorso de las manos, miositis, esclerodactilia, hipomotilidad esofágica, afección pulmonar, hipergammaglobulinemia y factor reumatoide (1,155,216-221). En pacientes con lupus eritematoso sistémico los anticuerpos anti-RNP se han relacionado con una mayor

frecuencia de vasculitis cutánea (45,176), miocarditis (222), fenómeno de Raynaud y esclerodactilia. La nefropatía parece ser menos frecuente y severa, tal vez por la baja incidencia de anticuerpos anti-ADN nativo (1,63,188,223). Otros estudios no encuentran ninguna correlación clínica asociada a los anticuerpos anti-RNP (153), en particular en lo que se refiere a la afección renal (174,193,202,224).

El immunoblotting confirma algunas de las asociaciones. Los pacientes con enfermedad mixta del tejido conectivo y anticuerpos anti-70Kd o anti-A presentan con frecuencia artritis, edema en el dorso de las manos, esclerodactilia, fenómeno de Raynaud, miositis, hipergammaglobulinemia y factor reumatoide. La incidencia de nefropatía es inferior a un 20%, es leve y aparece en pacientes que desarrollan lupus eritematoso sistémico. En la esclerodermia los anticuerpos anti-RNP asocian más artritis y menos afección renal. Los pacientes lúpicos con anticuerpos anti-70Kd y anti-A presentan hallazgos similares. La nefropatía es poco frecuente, aunque la asociación es débil. Los sueros anti-RNP de lupus eritematoso sistémico presentan niveles aumentados de anticuerpos anti-ADN nativo.

En conjunto los anticuerpos anti-70Kd y anti-A se asocian significativamente con una mayor frecuencia de fenómeno de Raynaud, edema en manos, esclerodactilia (141,154,196,197,215, 225) y artritis (196,226), y con una baja incidencia de nefropatía severa (215,227).

### 3.-Anticuerpos anti-Ro.

Los anticuerpos anti-Ro se detectan mediante inmunodifusión ó contraímmunoelectroforesis en un 30-70% de pacientes con síndrome de Sjögren (25-27,228-230), en un 25-40% en lupus eritematoso sistémico (26,187,189,230,231), en un 4-30% en esclerodermia (208-210,219,232), en un 4-10% en polimiositis (172,177,232), en un 2-10% en artritis reumatoide (212,232-235) y en algunos pacientes con otras enfermedades (16). Son más frecuentes en el síndrome de Sjögren primario y en el asociado a lupus eritematoso sistémico que en el asociado a la artritis reumatoide (236-239). No permiten diferenciar el primario del asociado a conectivopatías (240).

El immunoblotting detecta anticuerpos anti-Ro en el 43% de pacientes con síndrome de Sjögren primario, en el 35% en lupus eritematoso sistémico, en el 9% en artritis reumatoide, en el 7% en esclerodermia y en algunos pacientes con otras enfermedades. Los porcentajes son similares a los encontrados por Ben-Chetrit y col (33) y Slobbe y col (121) en lupus eritematoso sistémico, algo menores en el síndrome de Sjögren primario. Se confirma el predominio de anticuerpos anti-Ro 52Kd en el síndrome de Sjögren y de anticuerpos anti-Ro 60Kd en el lupus eritematoso sistémico, aunque en esta última enfermedad es frecuente encontrar ambos simultáneamente. En la artritis reumatoide se detectan mayoritariamente anticuerpos anti-Ro 60Kd, especialmente en ausencia de

anti-Ro 52Kd. En el resto de procesos con anti-Ro predominan los anticuerpos anti-Ro 60Kd o los anticuerpos anti-Ro nativo, caso del lupus eritematoso cutáneo subagudo. La excepción es el lupus neonatal en el que se detectan mayoritariamente anticuerpos anti-Ro 52Kd (241).

La presencia de anticuerpos anti-Ro en lupus eritematoso sistémico se asocia con una mayor incidencia de fotosensibilidad y lesiones cutáneas (102,189,242-244), fenómeno de Raynaud, trombopenia, síndrome de Sjögren e hipergammaglobulinemia (74,102,230,231,237,242). Un 50-70% de sueros anti-Ro presentan factor reumatoide positivo y se ha sugerido reacción cruzada entre ambos (36,74,102,245-248). Se ha comunicado un mayor riesgo de afección cardiopulmonar (249,250), que debe confirmarse, y una baja incidencia y severidad de nefropatía (251). En algunos casos los anticuerpos anti-Ro pueden estar implicados en el desarrollo de la afección renal. Maddison y Reichlin (252) observaron una disminución de anticuerpos anti-Ro en dos pacientes coincidiendo con un grave deterioro de la función renal. Tras su fallecimiento se comprobó la existencia de una glomerulonefritis proliferativa difusa y en los eluidos renales se detectaron anticuerpos anti-Ro y anti-ADN monocatenario, no anticuerpos anti-ADN nativo. Los pacientes lúpicos con anticuerpos anti-Ro sin anticuerpos anti-La parecen presentar un mayor riesgo de nefropatía severa que los que tienen anticuerpos anti-Ro y anticuerpos anti-La asociados (243), en relación a los bajos niveles de anticuerpos

anti-ADN nativo en el segundo grupo.

El inmunoblotting es poco útil para analizar estas asociaciones ya que muchos sueros anti-Ro reconocen exclusivamente el antígeno Ro nativo y no reaccionan en inmunoblotting. En este estudio la presencia de anticuerpos anti-Ro definidos mediante contrainmunolectroforesis e inmunoblotting se asocia en lupus eritematoso sistémico con fotosensibilidad y menor incidencia de vasculitis, afección neurológica y nefropatía severa, aunque en estas últimas la asociación es débil. Los anticuerpos anti-Ro 52Kd se asocian con una mayor frecuencia de fotosensibilidad, menor afección renal y niveles elevados de factor reumatoide.

Los anticuerpos anti-Ro son característicos de algunas formas clínicas particulares de la enfermedad lúpica:

- \* En algunos pacientes con lupus eritematoso sistémico los AAN son persistentemente negativos cuando se examinan mediante inmunofluorescencia sobre hígado o riñón de rata. Este subgrupo, denominado "lupus AAN negativo", que respresenta el 5-10% de todos los lupus eritematosos sistémicos (36), presenta con frecuencia anticuerpos anti-Ro ó anti-ADN monocatenario. Se cararacteriza por una mayor frecuencia de rash malar, fotosensibilidad y factor reumatoide. La incidencia de afección renal y neurológica es baja. La mayoría de estos sueros son positivos si la inmunofluorescencia se realiza sobre

células humanas (77). Solo uno de los 107 pacientes ha presentado inmunofluorescencia persistentemente negativa y tiene anticuerpos anti-Ro 60Kd en immunoblotting.

\* Sontheimer y col (253) describieron un subgrupo de lupus con lesiones cutáneas no discoides, anulares o psoriasiformes, eritematosas, extensas y muy fotosensibles. Lo denominaron "lupus eritematoso cutáneo subagudo" y se asocia con la presencia de factor reumatoide y anticuerpos anti-Ro. Estos últimos aparecen en un 60-70% de los casos (37,253). La mitad de los pacientes presenta rasgos de lupus eritematoso sistémico, generalmente manifestaciones leves como artritis, artralgiás, fiebre y mialgiás. Los cinco pacientes sin criterios de lupus eritematoso sistémico que han sido estudiados presentan anticuerpos anti-Ro nativo, pero solo en dos se detectan mediante immunoblotting anticuerpos anti-Ro 60Kd.

\* El lupus neonatal se caracteriza por la aparición de lesiones cutáneas de lupus y/o bloqueo cardíaco congénito en recién nacidos. Las lesiones cutáneas son anulares o papulares, aparecen en la primera semana de vida y desaparecen hacia el sexto mes. Un 10-20% de las madres presentan lupus eritematoso sistémico o síndrome de Sjögren y otro 20% lo desarrollan posteriormente. Todos los niños y sus madres presentan anticuerpos anti-Ro o anticuerpos

anti-La (39,40,254-256). En general son anticuerpos anti-Ro 52Kd, aunque pueden detectarse anticuerpos anti-Ro 60Kd en algunos pacientes (241).

\* Los lupus asociados a déficit congénito de fracciones del complemento, en particular de C2, presentan manifestaciones cutáneas similares a las de los subgrupos anteriores y en un 50-75% de los casos asocian anticuerpos anti-Ro (38,257).

La presencia de anticuerpos anti-Ro en pacientes con síndrome de Sjögren primario se asocia con una mayor frecuencia de manifestaciones extraglandulares como adenopatías, púrpura, anemia, leucopenia, trombopenia, hipergammaglobulinemia, crioglobulinemia, factor reumatoide, vasculitis y afección neurológica (228,233,258-260). La enfermedad parece ser más benigna en los pacientes sin anticuerpos anti-Ro, grupo que pocas veces presenta vasculitis (240). En este estudio los anticuerpos anti-Ro definidos mediante contrainmunolectroforesis e immunoblotting se asocian con una mayor incidencia de afección neurológica y de factor reumatoide positivo.

En pacientes con artritis reumatoide se ha comunicado una mayor frecuencia de manifestaciones extraarticulares en relación con la presencia de anticuerpos anti-Ro (160). En particular habría más vasculitis (236), afección pulmonar (186), síndrome de Sjögren (234), anemia, factor reumatoide y toxicidad por d-penicilamina (261,262). La

detección de anticuerpos anti-Ro mediante immunoblotting muestra únicamente una mayor incidencia de síndrome de Sjögren y mayores niveles de factor reumatoide en dichos pacientes.

#### 4.- Anticuerpos anti-La.

Los anticuerpos anti-La se detectan mediante contrainmunolectroforesis o inmunodifusión en un 50-80% de pacientes con síndrome de Sjögren primario (5,23,25,27,230,236,237,244,263,264), en un 5-15% en lupus eritematoso sistémico (27,237,240,263), en un 1-8% en artritis reumatoide (5,212,265), en un 1-6% en esclerodermia (25,208-210) y en algunos pacientes con otras enfermedades (16). En el síndrome de Sjögren asociado a lupus eritematoso sistémico aparecen en un 70% de casos (244,266), en el asociado a la artritis reumatoide sólo en un 3-8% (25,236,240,244,267). El immunoblotting muestra porcentajes similares: 43% en síndrome de Sjögren primario, 16% en lupus eritematoso sistémico, 4% en artritis reumatoide y 3% en esclerodermia. Coinciden con los obtenidos por De Rooij y col (15).

Los anticuerpos anti-La suelen aparecer junto a los anticuerpos anti-Ro y se han relacionado en lupus eritematoso sistémico con lesiones cutáneas, fotosensibilidad, síndrome de Sjögren, hipergammaglobulinemia y factor reumatoide (102,263), y con una baja incidencia de nefropatía (268). Los

anticuerpos anti-La detectados mediante immunoblotting, se asocian con fotosensibilidad, mayores niveles de factor reumatoide, baja incidencia de nefropatía y menores niveles de anticuerpos anti-ADN nativo (154). La mayoría de los pacientes con lupus neonatal presenta anticuerpos anti-La (269).

#### 5.- Anticuerpos anti-Scl 70.

Los anticuerpos anti-Scl 70 se consideran marcadores de esclerodermia (16,42,113) aunque no diferencian la esclerosis sistémica progresiva del síndrome CREST (210). Se detectan mediante inmunodifusión en un 20-40% de pacientes con esclerosis sistémica progresiva (41,113,208-210,270) y en un 5-10% de pacientes con síndrome CREST (41,113,208,209). Aparecen en menos de un 5% de pacientes con otras conectivopatías (16), en particular en presencia de enfermedad de Raynaud primaria o de síndromes de superposición (overlap). El immunoblotting, por su mayor sensibilidad, detecta anticuerpos anti-Scl 70 en un 30-60% de pacientes con esclerosis sistémica progresiva (15,114,271,272) y en un 10-20% de casos con síndrome CREST (271,272).

Los anticuerpos anti-Scl 70 se asocian significativamente con esclerosis cutánea difusa y enfermedad intersticial pulmonar, tanto si se detectan mediante inmunodifusión (270,273,274) como si se utiliza el immunoblotting (271,275).

## **6.-Anticuerpos anti-Jo 1.**

Los anticuerpos anti-Jo 1 son prácticamente específicos de polimiositis y se detectan en un 20-30% de pacientes (44,107, 109,276-280). De Rooij y col (15) los detectan mediante inmunoblotting en un 42% de casos. Se han relacionado con una mayor frecuencia de artritis, fenómeno de Raynaud y enfermedad intersticial pulmonar (43,281-283), rasgos que presentan los dos pacientes con anticuerpos anti-Jo 1 incluidos en esta serie.

### **Nuevos anticuerpos anti-ENA definidos mediante inmunoblotting.**

La técnica de inmunoblotting con extractos semipurificados como fuente de antígeno permite identificar nuevos sistemas, no detectados mediante inmunodifusión, contrainmunolectroforesis o precipitación inmune. Recientemente se han descrito dos nuevos autoantígenos reconocidos por sueros de pacientes con artritis reumatoide (284,285) y en este estudio se han detectado otros dos que reaccionan con sueros de pacientes con diferentes procesos.

### **1.-Anticuerpos anti-48Kd de placenta humana o anti-Sa.**

En el curso de ensayos dirigidos a caracterizar los componentes proteicos de la partícula Ro-ARN, Ménard y col (285) identificaron una proteína de peso molecular 48Kd que reacciona en inmunoblotting con sueros de pacientes

diagnosticados de artritis reumatoide. El antígeno se denominó Sa por las iniciales del primer paciente (Savoie). Aparece en extractos salinos de bazo o placenta humanos y se desconoce por el momento su localización celular y su naturaleza. Los anticuerpos anti-Sa no precipitan en geles de agarosa y la precipitación inmune con células HeLa marcadas demuestra que no está asociado a ARN. No se relaciona con el virus de Epstein-Barr y carece de actividad factor reumatoide (286). Es resistente a nucleasas y sensible a proteinasa K. Es posible que el antígeno Sa sea similar a la proteína de 48Kd identificada por Melson y col (287) en inmunocomplejos circulantes de pacientes con artritis reumatoide. Es diferente al antígeno RA-33 (288).

Los anticuerpos anti-Sa se detectan en un 32% de pacientes con artritis reumatoide y no aparecen en individuos con otras enfermedades.

## **2.-Anticuerpos anti-44Kd de timo de conejo o anti-RTE-44.**

Los anticuerpos anti-44Kd reaccionan con una proteína similar al péptido de 45Kd reconocido por sueros anti-RNP y anti-Sm en el estudio de Francoeur (135,289), pero no está unida a ARN (G. Boire, comunicación personal). Se desconoce su naturaleza, su estructura y su localización celular. Los anticuerpos anti-44Kd se detectan en pacientes con lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide y otras enfermedades reumáticas. En 62

pacientes con lupus eritematoso sistémico estudiados se encontró asociación con rash discoide y alopecia (290).

### 3.-Anticuerpos anti-58Kd de timo de conejo o anti-RTE-58.

El antígeno RTE-58 corresponde probablemente a la proteína de 56Kd descrita por Van Venrooij y col (291) y reconocida por sueros de pacientes con distintas conectivopatías. La proteína de 56Kd se localiza en citoplasma de células HeLa y es diferente de la vimentina y otras proteínas del citoesqueleto. Los anticuerpos anti-56Kd no son específicos de ninguna enfermedad (15). Los anticuerpos anti-RTE-58 tampoco lo son, aunque aparecen generalmente en lupus eritematoso sistémico y en artritis reumatoide. En 62 pacientes con lupus eritematoso sistémico se han relacionado con una mayor incidencia de fenómeno de Raynaud, serositis y enfermedad intersticial pulmonar (290).

## CONCLUSIONES

1.- El immunoblotting es una técnica reproducible y permite detectar simultáneamente los principales anticuerpos anti-ENA en el suero de pacientes con enfermedades reumáticas sistémicas.

- identifica los diferentes polipéptidos reconocidos por los anticuerpos anti-RNP, anti-Sm y anti-Ro.
- la lectura es sencilla si se colocan en cada blot los sueros de referencia adecuados y se conocen los patrones positivos para cada anticuerpo.
- puede realizarse en la mayoría de los laboratorios clínicos.

2.- Las condiciones óptimas para detectar anticuerpos anti-ENA mediante immunoblotting son las siguientes:

- electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS T=18% (200 voltios, 45 minutos), aplicando un volumen de 100 µl y 800-1000 µg de extracto en cada gel.
- transferencia a papel de nitrocelulosa (100 voltios, 75 minutos).
- incubación con sueros diluidos 1:5 y lavados del papel con Tween-20.

3.- El antígeno es fácil de obtener y no es indispensable trabajar con líneas celulares humanas ni utilizar protocolos sofisticados de purificación. El

antígeno se obtiene de:

- timo de conejo extraído con ClNa 350 mM, que contiene los antígenos La, Scl-70, Jo-1, RNP (70Kd, A y C) y Sm (BB' y D).
- placenta humana extraída con ClNa 300mM, que contiene los antígenos La y Ro (Ro 52Kd y Ro 60Kd).

4.- El inmunoblotting es más sensible y específico que la contrainmunolectroforesis o la inmunodifusión, excepto en la detección de los anticuerpos anti-Ro:

- el 24% de los sueros anti-Ro reaccionan exclusivamente con el antígeno Ro nativo y son negativos en inmunoblotting.
- el 20% presentan contrainmunolectroforesis negativa y reaccionan en inmunoblotting, generalmente contra el antígeno Ro60Kd (73%).
- el 56% reaccionan en contrainmunolectroforesis y en inmunoblotting, reconociendo el antígeno Ro 52Kd (45%), el antígeno Ro 60Kd (28%) o ambos.

5.- La distribución de los diagnósticos para cada subgrupo de anticuerpos definido mediante inmunoblotting muestra que:

- la mayoría de los anticuerpos anti-La aparecen en pacientes con lupus eritematoso sistémico o con síndrome de Sjögren.
- los anticuerpos anti-Scl 70 se detectan en

pacientes con esclerodermia o enfermedad de Raynaud primaria.

- los anticuerpos anti-Jo 1 aparecen en pacientes con polimiositis.
- los anticuerpos anti-RNP (anti-70, anti-A y/o anti-C) se detectan en pacientes con lupus eritematoso sistémico o enfermedad mixta del tejido conectivo. Los anticuerpos anti-70Kd aparecen en todos los sueros de enfermedad mixta del tejido conectivo y en el 20% de sueros de lupus eritematoso sistémico.
- en la respuesta anti-Sm los anticuerpos anti-BB' son más frecuentes que los anticuerpos anti-D y, de ellos, solo los anticuerpos anti-D son específicos de lupus eritematoso sistémico.
- sueros definidos mediante contrainmunolectroforesis como anti-RNP pueden reaccionar con BB' y D, y sueros anti-Sm reconocen los péptidos 70Kd, A y C. En ambos casos pueden existir reacciones cruzadas.
- la heterogeneidad de los patrones anti-Ro sugiere que esta respuesta es diferente en el lupus eritematoso sistémico (anti-Ro 52Kd y 60Kd asociados), el síndrome de Sjögren primario (anti-Ro 52Kd y anti-La), la artritis reumatoide (anti-Ro 60Kd), el lupus neonatal (anti-Ro 52Kd y anti-La) y el lupus eritematoso cutáneo subagudo (anti-Ro nativo).

6.- El inmunoblotting confirma las principales correlaciones clínicas establecidas mediante contrainmunolectroforesis o inmunodifusión:

- los anticuerpos anti-70Kd y anti-A (RNP) se asocian con un aumento significativo de la frecuencia de fenómeno de Raynaud, edema en manos, esclerodactilia y artritis en pacientes con enfermedad mixta del tejido conectivo y lupus eritematoso sistémico. En ambos procesos la incidencia de nefropatía es baja en presencia de anticuerpos anti-RNP.
- los anticuerpos anti-BB'(Sm) se correlacionan con una mayor incidencia de trombosis arterial o venosa y con mayores niveles de anticuerpos anti-ADN nativo. Los pacientes con anticuerpos anti-D(Sm) presentan más vasculitis, fenómeno de Raynaud y artritis.
- los anticuerpos anti-Scl 70 se asocian significativamente con esclerosis cutánea difusa y enfermedad intersticial pulmonar en pacientes con esclerodermia.
- los pacientes con lupus eritematoso sistémico y anticuerpos anti-La presentan con mayor frecuencia fotosensibilidad y factor reumatoide positivo, niveles bajos de anticuerpos anti-ADN nativo y baja incidencia de nefropatía.
- los anticuerpos anti-Ro se asocian con un aumento significativo de fotosensibilidad y factor

reumatoide en el lupus eritematoso sistémico; síndrome de Sjögren y factor reumatoide en la artritis reumatoide; y afección neurológica y factor reumatoide en el síndrome de Sjögren primario.

7.- El inmunoblotting permite detectar nuevos anticuerpos anti-ENA, en particular los anticuerpos anti-48Kd de placenta humana o anti-Sa de posible valor diagnóstico en la artritis reumatoide.

## RESUMEN

El desarrollo de métodos inmunoenzimáticos como el ELISA o el immunoblotting ha proporcionado nuevos sistemas para identificar los anticuerpos anti-ENA, mucho más sensibles que la contrainmunolectroforesis o la inmunodifusión en geles de agarosa. Mediante immunoblotting se ha demostrado que los anticuerpos anti-RNP reaccionan con tres polipéptidos (70 Kd, A y C), los anticuerpos anti-Sm con dos (BB' y D) y los anticuerpos anti-Ro con, al menos, otros dos (52Kd y 60Kd). Esta heterogeneidad obliga a reexaminar la incidencia y el significado clínico de los anticuerpos anti-ENA en las enfermedades reumáticas sistémicas. Para ello se ha estandarizado la técnica de immunoblotting utilizando extractos antigénicos fáciles de obtener. Se han estudiado 1645 sueros de 800 pacientes.

El protocolo descrito incluye la electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS con T=18%, la transferencia de las proteínas ya separadas al papel de nitrocelulosa y los lavados con Tween-20 tras la incubación con suero del paciente. Se detectan simultáneamente anticuerpos anti-La, anti-Scl 70, anti-Jo 1, anti-RNP y anti-Sm (extracto de tимо) o anticuerpos anti-La y anti-Ro (extracto de placenta). El immunoblotting es más sensible y específico que la contrainmunolectroforesis, excepto, en la detección de anticuerpos anti-Ro. Esto se debe a la existencia de sueros que reconocen exclusivamente el antígeno Ro nativo. Los anticuerpos anti-70Kd y anti-A

(RNP) son característicos de la enfermedad mixta del tejido conectivo pero no son específicos. Los anticuerpos anti-BB'(Sm) aparecen generalmente en el lupus eritematoso sistémico pero sólo los anticuerpos anti-D son específicos de dicha enfermedad. La respuesta anti-Ro parece ser diferente en el síndrome de Sjögren primario o en el lupus neonatal (anti-Ro 52Kd), en la artritis reumatoide (anti-Ro 60Kd) y en el lupus eritematoso sistémico (anti-Ro 60Kd y 52 Kd asociados).

El inmunoblotting confirma las principales correlaciones clínicas de los anticuerpos anti-ENA y descubre otras nuevas, como la asociación existente entre los anticuerpos anti-BB' y la trombosis en pacientes con lupus eritematoso sistémico. Además permite identificar nuevos autoanticuerpos, entre ellos los dirigidos contra una proteína de 48Kd, de placenta humana (anticuerpos anti-Sa), que aparecen exclusivamente en pacientes con artritis reumatoide.

**Tabla 1.- Distribución de los pacientes en el grupo A (enfermedades reumáticas inflamatorias con alta probabilidad de presentar anticuerpos anti-ENA)**

<b>Diagnóstico</b>	<b>Pacientes</b>	<b>Sueros</b>
lupus eritematoso sistémico *	127	486
lupus eritematoso crónico discoide	15	18
lupus eritematoso cutáneo subagudo	5	10
lupus neonatal	3	4
bloqueo cardíaco congénito	8	10
esclerodermia *	28	51
polimiositis *	9	20
enfermedad mixta del tejido conectivo	6	6
queratoconjuntivitis sicca	11	12
síndrome de Sjögren primario	21	34
enfermedad de Raynaud primaria	23	28
conectivopatía no filiada	18	30
	274	709

\*incluyen pacientes que cumplían criterios de enfermedad mixta del tejido conectivo (4 lupus eritematoso sistémico, 5 esclerodermia, 1 polimiositis).

**Tabla 2.- -Distribución de los pacientes en el grupo B (enfermedades reumáticas inflamatorias con baja probabilidad de presentar anticuerpos anti-ENA).**

Diagnóstico	timo de conejo pacientes (sueros)		placenta humana pacientes (sueros)	
artritis reumatoide	154	(175)	325	(718)
artritis psoriásica	9	( 9)	53	( 62)
síndrome de Reiter	2	( 2)	14	( 14)
espondilitis anquilosante	0	( 0)	24	( 24)
polimialgia reumática	0	( 0)	4	( 6)
vasculitis:	7	( 11)	12	( 18)
- eritema nodoso	1	2		
- granulomatosis de Wegener	1	1		
- poliarteritis nodosa	2	4		
- vasculitis leucocitoclástica	2	4		
- vasculitis aislada del sistema nervioso central	1	1		
	179		444	

**Tabla 3.-** Distribución de los pacientes en el grupo C (otras enfermedades, reumática o no, con baja probabilidad de presentar anticuerpos anti-ENA).

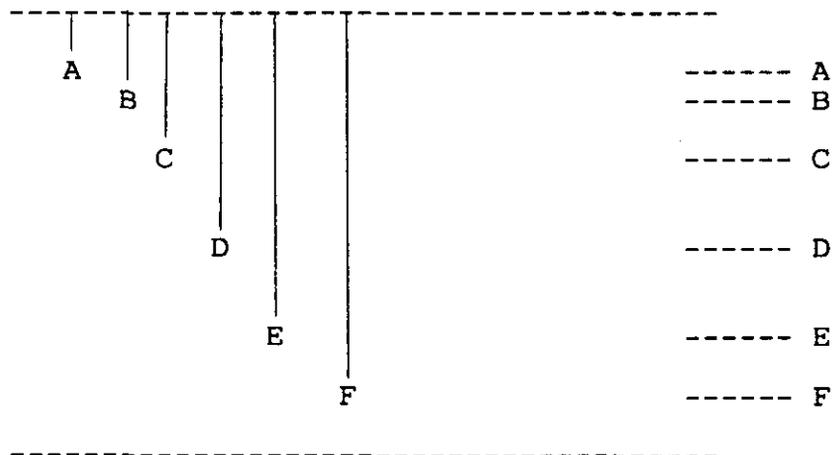
Diagnóstico	timo de conejo pacientes (sueros)		placenta humana pacientes (sueros)	
Miscelánea	25	(25)	57	(57)
Sarcoidosis	1		2	
enfermedad de Crohn	1		1	
cirrosis biliar primaria	2		2	
condrocalcinosis	1		3	
artrosis	2		20	
trombosis arterial	0		1	
tiroiditis autoinmune	2		2	
glomerulonefritis idiopática	8		10	
fiebre reumática	0		1	
abortos recurrentes	0		1	
distrofia simpática refleja	0		4	
anemia hemolítica	3		4	
fibromialgia	1		1	
trombopenia autoinmune	2		2	
tuberculosis	0		1	
gota	1		1	
inmunodeficiencia c. variable	1		1	
Monoartritis-poliartritis				
sin filiar	11	(12)	37	(46)
Controles sanos	55	(55)	55	(55)
	116		206	

**Tabla 4.-** Cálculo del peso molecular. Controles de peso molecular (low molecular weigh markers, Pharmacia).

Proteína	Peso molecular	log 10	Rf*	distancias (cm)	
fosforilasa B	94.000	4.97	0.10	0.50	<b>A</b>
albúmina	67.000	4.82	0.15	0.75	<b>B</b>
ovoalbúmina	43.000	4.63	0.26	1.30	<b>C</b>
anhidrasa carbónica	30.000	4.47	0.43	2.15	<b>D</b>
inhibidor tripsina	20.100	4.30	0.61	3.05	<b>E</b>
alfa-lactoalbúmina	14.400	4.15	0.75	3.75	<b>F</b>

\* distancia total recorrida por el frente proteico en la electroforesis = 5 cm.

$$Rf = \frac{\text{distancia recorrida por cada proteína}}{\text{distancia total del frente proteico}}$$



**Tabla 5.-** Cálculo del peso molecular. Sueros de referencia positivos utilizando extractos de timo y placenta.

distancias (cm)	Rf*	log10	peso molecular(d)	antígeno
0.45	0.09	5.00	100.000	
0.55	0.11	4.93	86.000	
0.80	0.16	4.81	65.000	
0.95	0.19	4.74	56.000	<b>Scl-70</b>
1.45	0.29	4.59	39.000	
2.55	0.51	4.39	25.000	
1.20	0.24	4.66	46.000	<b>Jo-1</b>
0.70	0.14	4.84	70.000	<b>70Kd</b>
1.85	0.37	4.51	33.000	<b>A RNP</b>
2.85	0.57	4.34	22.000	<b>C</b>
2.30	0.46	4.44	28.000	<b>B</b>
2.15	0.43	4.46	29.000	<b>B'</b>
3.75	0.75	4.14	14.000	<b>C</b>
0.90	0.18	4.77	60.000	<b>60Kd</b>
1.05	0.21	4.71	52.000	<b>52Kd Ro</b>
1.20	0.24	4.65	45.000	
1.60	0.32	4.56	37.000	<b>La</b>
1.70	0.34	4.54	35.000	

\* distancia total recorrida por el frente proteico = 5 cm.

Log 10 PM EXTRACTO DE TIMO

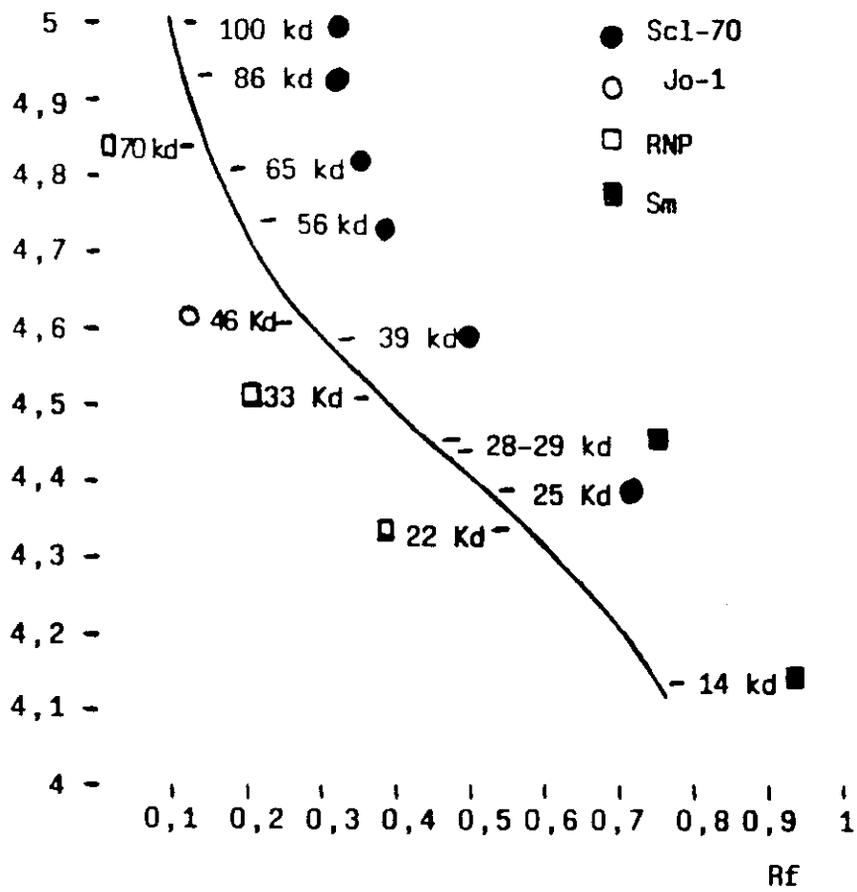


Tabla 5a.- Curva de cálculo de los pesos moleculares.

Log.10 PM EXTRACTO DE PLACENTA

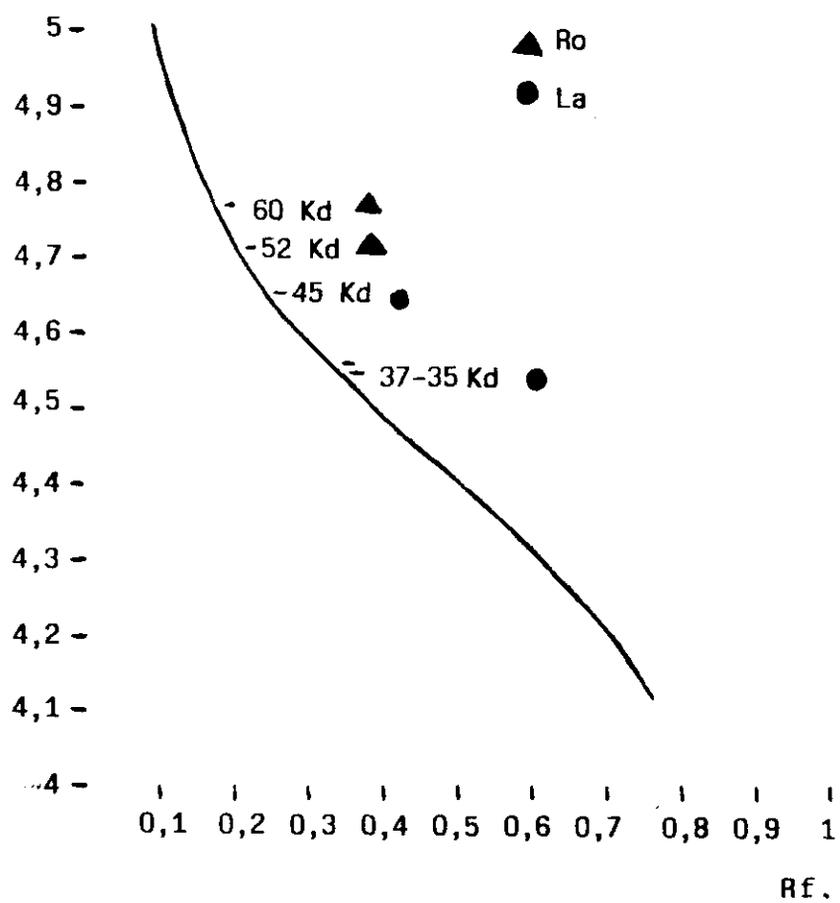


Tabla 5b.- Curva de cálculo de los pesos moleculares.

**Tabla 6.- Resultados del inmunoblotting con extracto de timo en 998 sueros de 537 pacientes.**

<b>Anticuerpos</b>	<b>sueros (%)</b>	<b>pacientes (%)</b>
anti-La	96 (9.6)	34 (6.3)
anti-70Kd	84 (8.4)	40 (7.4)
anti-A	100 (10.0)	43 (8.0)
anti-C	72 (7.2)	36 (6.7)
anti-BB'	139 (13.9)	42 (7.8)
anti-D	53 (5.3)	21 (3.9)
anti-Scl 70	20 (2.0)	12 (2.2)
anti-Jo 1	9 (0.9)	2 (0.3)
anti-58Kd	106 (10.6)	72 (13.4)
anti-44Kd	185 (18.5)	91 (16.9)

**Tabla 7.-Distribución de diagnósticos en pacientes con anticuerpos anti-La, anti-Scl 70 y anti-Jol.**

<b>Diagnóstico</b>	<b>n=34 anti-La n (%)</b>	<b>n=12 antiScl70 n (%)</b>	<b>n=2 anti-Jol n (%)</b>
lupus eritematoso sistémico	14 (41.1)	0	0
artritis reumatoide	6 (17.6)	0	0
enfermedad mixta	1 (2.9)	0	0
Raynaud primario	0	2 (16.6)	0
esclerodermia	0	10 (83.3)	0
conectivopatía no definida	1 (2.9)	0	0
Sjögren primario	8 (23.5)	0	0
polimiositis	0	0	2 (100)
lupus cutáneo subagudo	2 (5.8)	0	0
lupus neonatal	2 (5.8)	0	0

**Tabla 8.-** Distribución de diagnósticos en pacientes con anticuerpos anti-RNP (70, A, C) y anti-Sm (BB', D).

Diagnóstico	n=40 anti-70 n (%)	n=43 anti-A n (%)	n=36 anti-C n (%)	n=42 anti-BB' n (%)	n=21 anti-D n (%)
lupus eritematoso sistémico	25 (62.5)	28 (65.1)	27 (75.0)	36 (85.7)	19 (90.4)
enfermedad mixta *	14 (35.0)	14 (32.5)	7 (19.4)	3 (7.1)	1 (4.7)
esclerodermia	1 (2.5)	1 (2.3)	0	0	0
conectivopatía no definida	0	0	0	1 (2.3)	1 (4.7)**
artritis reumatoide	0	0	2 (5.5)	2 (4.7)	0

\* incluye pacientes que desarrollaron lupus sistémico o esclerodermia.

\*\* tres criterios de lupus eritematoso sistémico (artritis no erosiva, AAN y Ac anti-ADN nativo elevados).

**Tabla 9.-** Distribución de diagnósticos en pacientes con anticuerpos anti-RNP (combinaciones de anti-70, anti-A y anti-C).

Diagnóstico	n=36 anti-70 y A	n=61 anti-A y/o anti-A y/o anti-C	n=30 anti-RNP sin anti-Sm
lupus eritematoso sistémico	22 (61.1)	42 (68.8)	14 (46.6)
enfermedad mixta *	13 (36.1)	16 (26.2)	13 (43.3)
esclerodermia	1 (2.7)	1 (1.6)	1 (3.3)
conectivopatía no definida	0	0	0
artritis reumatoide	0	2 (3.2)	2 (6.6)

\* incluye pacientes que desarrollaron lupus eritematoso sistémico o esclerodermia.

**Tabla 10.-** Distribución de diagnósticos en pacientes con anticuerpos anti-Sm (BB', D).

Diagnóstico	n=48 anti-BB' y/o D n (%)	n=13 anti-BB' y D n (%)	n=17 anti-Sm sin anti-RNP n (%)	n=31 anti-RNP y anti-Sm n (%)
lupus eritematoso sistémico	42 (87.5)	12 (92.3)	14 (82.3)	28 (90.3)
enfermedad mixta *	3 (6.2)	0	0	3 (9.6)
conectivopatía no definida **	1 (2.0)	1 (7.6)	1 (5.8)	0
artritis reumatoide	2 (4.1)	0	2 (11.7)	0

\* incluye pacientes que desarrollaron lupus sistémico o esclerodermia.

\*\* tres criterios de lupus eritematoso sistémico (artritis no erosiva, AAN y anticuerpos anti-ADN nativo elevados).

**Tabla 11.- Distribución de diagnósticos en pacientes con anticuerpos anti-58 Kd y anti-44 Kd.**

Diagnóstico	n=72 anti-58 Kd		n=91 anti-44 Kd	
	n	(%)	n	(%)
lupus eritematoso sistémico	26	(36.1)	35	(38.4)
artritis reumatoide	24	(33.3)	29	(31.8)
enfermedad mixta	6	(8.3)	3	(3.2)
Raynaud primario	1	(1.3)	6	(6.5)
esclerodermia	2	(2.7)	5	(5.4)
conectivopatía no definida	4	(5.5)	1	(1.0)
Sjögren primario	5	(6.9)	1	(1.0)
bloqueo AV congénito	1	(1.3)	2	(2.1)
granulomatosis de Wegener	1	(1.3)	0	
condrocalcinosis	1	(1.3)	0	
glomerulonefritis idiopática	1	(1.3)	0	
poliomiositis	0		2	(2.1)
lupus crónico discoide	0		3	(3.2)
artritis psoriásica	0		1	(1.0)
poliarteritis nodosa	0		1	(1.0)
vasculitis aislada SNC	0		1	(1.0)
tiroiditis autoinmune	0		1	(1.0)

Tabla 12.- Resultados del inmunoblotting con extracto de placenta en 1709 sueros de 855 pacientes.

Anticuerpos	sueros (%)	pacientes (%)
Anti-La	120 (7.0)	48 (5.6)
Anti-Ro 52 Kd	132 (7.7)	55 (6.4)
Anti-Ro 60 Kd	134 (7.8)	75 (8.7)
Anti-Ro 52 aislado	77 (4.5)	21 (2.4)
Anti-Ro 60 aislado	79 (4.6)	41 (4.7)
Anti-Ro 52 y Ro 60	55 (3.2)	34 (3.9)
Anti-48 Kd	202 (11.8)	103 (12.0)

**Tabla 13.-** Distribución de diagnósticos en pacientes con anticuerpos anti-Ro 52 Kd, anti-Ro 60 Kd y anti-La.

Diagnóstico	n=55	n=75	n=48
	anti-Ro 52 n (%)	anti-Ro 60 n (%)	anti-La n (%)
lupus eritematoso sistémico	32 (58.1)	40 (53.3)	21 (43.7)
artritis reumatoide	9 (16.3)	26 (34.6)	9 (18.7)
lupus cutáneo subagudo	0	2 (2.6)	3 (6.3)
lupus discoide	1 (1.8)	0	1 (2.0)
lupus neonatal	2 (3.6)	0	2 (4.1)
esclerodermia	1 (1.8)	1 (1.3)	1 (2.0)
polimiositis	0	1 (1.3)	1 (2.0)
Sjögren primario	9 (16.3)	1 (1.3)	9 (18.7)
conectivopatía no definida	1 (1.8)	2 (2.6)	1 (2.0)
Raynaud primario	0	1 (1.3)	0
artritis psoriásica	0	1 (1.3)	0

**Tabla 14.-** Distribución de diagnósticos en pacientes con anticuerpos anti-Ro 52Kd y anti-Ro 60Kd, aislados y asociados.

Diagnóstico	n=21 anti-Ro52Kd aislado n (%)	n=41 anti-Ro 60Kd aislado n (%)	n=34 anti-Ro 52 y 60Kd n (%)
lupus eritematoso sistémico	5 (23.8)	13 (31.7)	27 (79.4)
artritis reumatoide	3 (14.2)	20 (48.7)	6 (17.6)
lupus cutáneo subagudo	0	2 (4.8)	0
lupus discoide	1 (4.7)	0	0
lupus neonatal	2 (9.5)	0	0
esclerodermia	1 (4.7)	1 (2.4)	0
polimiositis	0	1 (2.4)	0
Sjögren primario	8 (38.0)	0	1 (2.9)
conectivopatía no definida	1 (4.7)	2 (4.8)	0
Raynaud primario	0	1 (2.4)	0
artritis psoriásica	0	2 (2.4)	0

**Tabla 15.-** Distribución de los diagnósticos en pacientes con anticuerpos anti-Ro52La, anti-Ro60La y anti-Ro52/60La.

<b>Diagnóstico</b>	<b>n=13 anti-Ro52La n (%)</b>	<b>n=8 anti-Ro60La n (%)</b>	<b>n=19 anti- Ro52/60La n (%)</b>
lupus eritematoso sistémico	3 (23.0)	1 (12.5)	17 (89.4)
artritis reumatoide	2 (15.3)	4 (50.0)	1 (5.2)
lupus cutáneo subagud	0	1 (12.5)	0
lupus discoide	1 (7.6)	0	0
lupus neonatal	2 (15.3)	0	0
polimiositis	0	1 (12.5)	0
Sjögren primario	5 (38.4)	0	1 (5.2)
conectivopatía no definida	0	1 (12.5)	0

**Tabla 16.-** Comparación de los resultados obtenidos mediante inmunoblotting y contraelectroforesis con extracto de timo en 367 sueros.

	n=61 anti-La n (%)	n=51 anti-RNP n (%)	n=49 anti-Sm n (%)	n=9 anti-Scl70 n	n=3 anti-Jol n
CIE positiva	43 (70.4)	25 (49.0)	21 (42.8)	9	2
IB positivo	60 (98.3)	51 (100)	49 (100)	9	3
CIE positivo IB negativo	1 (1.6)	0	0	0	0
CIE negativo IB positivo	18 (29.5)	26 (50.9)	28 (57.1)	0	1

CIE: contraelectroforesis, IB: inmunoblotting.

**Tabla 17.-** Resultados obtenidos mediante immunoblotting en sueros con anticuerpos anti-RNP o anti-Sm definidos mediante contrainmunolectroforesis.

Anticuerpos	n=17 anti-RNP sin anti-Sm		n=13 anti-Sm sin anti-RNP	
	n	(%)	n	(%)
anti-70kd	13	(76.4)	4	(30.7)
anti-A	11	(64.7)	6	(46.0)
anti-C	12	(70.5)	3	(23.0)
anti-BB'	4	(23.5)	12	(92.3)
anti-D	1	(5.8)	13	(100)

**Tabla 18.-** Comparación de los resultados obtenidos mediante inmunoblotting y contraimmunoelectroforesis con extracto de placenta en 480 sueros.

	<b>n=77 anti-La n (%)</b>	<b>n=153 anti-Ro n (%)</b>
CIE positiva	45 (58.4)	123 (80.3)
IB positivo	77 (100)	116 (75.8)
CIE positivo IB negativo	0	37 (24.1)
CIE negativa IB positivo	32 (41.5)	30 (19.6)
CIE positivo IB positivo	45 (58.4)	86 (56.2)

CIE: contraimmunoelectroforesis, IB: inmunoblotting.

**Tabla 19.-** Resultados obtenidos mediante inmunoblotting en sueros con anticuerpos anti-Ro definidos mediante conrainmunolectroforesis.

Anticuerpos Immunoblotting	n=86 anti-Ro CIE positiva IB positivo n (%)	n=30 anti-Ro CIE negativa IB positivo n (%)
anti-Ro 52Kd aislados	39 (45.3)	4 (13.3)
anti Ro 60Kd aislados	24 (27.9)	22 (73.3)
anti-Ro 52Kd asociados anti-Ro 60Kd	23 (26.7)	4 (13.3)

**Tabla 20.-** Hallazgos clínicos en 107 pacientes con lupus eritematoso sistémico (I).

	n	%
artralgias	98	91.5
artritis	83	77.5
rigidez matutina	28	26.1
erosiones articulares	5	4.6
pinzamientos articulares	8	7.4
nódulos subcutáneos	18	16.8
rash discoide	17	15.8
rash malar	70	65.4
alopecia	51	47.6
fotosensibilidad	59	55.1
úlceras orales	42	39.2
vasculitis cutánea	33	30.8
púrpura	13	12.1
edema en manos	12	11.2
esclerodactilia	5	4.6
telangiectasias	20	18.6
trombosis arterial/venosa	16	14.9
fenómeno de Raynaud	41	38.3
síndrome de Sjögren	6	5.6
afección neurológica	21	19.6

**Tabla 21.- Hallazgos clínicos en 107 pacientes con lupus eritematoso sistémico (II).**

	n	%
afección pulmonar	44	41.1
pleuritis	30	28.0
afección cardíaca	25	23.3
pericarditis	13	12.1
afección hepática	26	24.2
afección muscular	8	7.4
afección renal	72	67.2
hematuria	56	52.3
cilindruria	27	25.2
proteinuria	36	33.6
insuficiencia renal	25	23.3
afección hematológica	95	88.7
anemia	67	62.6
coombs positivo	10	9.3
leucopenia	63	58.8
linfopenia	30	28.0
trombopenia	23	21.4
hipergammaglobulinemia	71	66.3

**Tabla 22.-** Correlación clínica de los anticuerpos anti-RNP detectados mediante inmunoblotting en 107 pacientes con lupus eritematoso sistémico.

	n=37 anti-RNP positivo n (%)	n=70 anti-RNP negativo n (%)	chi *	OR
artritis	34 (91)	49 (70)	5.4	4.8
nódulos subcutáneos	12 (32)	6 (8)	8.2	5.1
edema en manos	8 (21)	4 (5)	4.6	4.5
fenómeno de Raynaud	24 (64)	17 (24)	15.1	5.7
proteinuria	7 (18)	29 (58)	4.5	0.3
insuficiencia renal	3 (8)	22 (31)	6.1	0.1
hipergammaglobulinemia	31 (83)	40 (57)	6.5	4.0
anti-RNP (CIE)	16 (43)	1 (1)	-	52.0
anti-Sm (CIE)	7 (18)	2 (2)	6.1	7.9

CIE: contraelectroforesis

\*p<0.05

**Tabla 23.-** Correlación clínica de los anticuerpos anti-Sm detectados mediante inmunoblotting en 107 pacientes con lupus eritematoso sistémico.

	n=35 anti-Sm positivo n (%)	n=72 anti-Sm negativo n (%)	chi *	OR
vasculitis	16 (45)	17 (23)	4.4	2.7
fenómeno de Raynaud	20 (57)	21 (29)	6.6	3.2
anti-RNP (IB)	25 (71)	12 (16)	28.8	12.5
anti-Sm (CIE)	8 (22)	1 (1)	-	21.0

IB: inmunoblotting, CIE: conrainmunolectroforesis.  
\*p<0.05.

**Tabla 24.-** Correlación clínica de los anticuerpos anti-La detectados mediante inmunoblotting en 107 pacientes con lupus eritematoso sistémico.

	n=19 anti-La positivo n (%)	n=88 anti-La negativo n (%)	chi *	OR
fotosensibilidad	16 (84)	43 (48)	6.5	5.5
factor reumatoide positivo	13 (68)	21 (23)	12.3	6.9
anti-Ro (IB)	18 (94)	20 (22)	-	61.2

IB: inmunoblotting.  
\*p<0.05.

**Tabla 25.-** Correlación clínica de los anticuerpos anti-Ro detectados mediante contraelectroforesis en 107 pacientes con lupus eritematoso sistémico.

	n=39 anti-Ro positivo n (%)	n=68 anti-Ro negativo n (%)	chi *	OR
fotosensibilidad	31 (79)	28 (41)	13.1	5.5
vasculitis	7 (17)	35 (51)	10.3	0.2
afección neurológica	3 (7)	18 (26)	4.4	0.2
proteinuria	7 (17)	29 (42)	5.7	0.2

\*p<0.05.

Tabla 26.- Hallazgos clínicos en 23 pacientes con esclerodermia.

	n	%
artralgias	16	69.5
artritis	11	47.8
erosiones articulares	3	13.0
alopecia	3	13.0
fotosensibilidad	2	8.6
úlceras orales	2	8.6
vasculitis cutánea	5	21.7
edema en manos	12	52.1
esclerosis cutánea difusa	12	52.1
esclerodactilia	19	82.6
telangiectasias	12	52.1
calcinosis	4	17.3
fenómeno de Raynaud	21	91.3
síndrome de Sjögren	6	26.0
hipomotilidad esofágica	15	65.2
enfermedad intersticial pulmonar	12	52.1
miopatía	5	21.7
afección renal	14	60.8
anemia	4	17.3
hipergammaglobulinemia	11	47.8

**Tabla 27.-** Correlación clínica de los anticuerpos anti-Scl 70 en la esclerodermia.

	n=7 anti-Scl70 positivo n (%)	n=16 anti-Scl70 negativo n (%)	alfa<	OR
esclerosis cutánea difusa	6 (85)	5 (37)	0.05	10.0
enfermedad intersticial pulmonar	6 (85)	6 (37)	0.05	10.0
AAN positivo	7 (100)	9 (56)	0.005	1.8

Tabla 28.- Hallazgos clínicos en 16 pacientes con enfermedad mixta del tejido conectivo (I).

	n	%
artralgias	2	12.5
artritis	13	81.2
nódulos subcutáneos	2	12.5
alopecia	2	12.5
rash discoide	1	6.2
rash malar	3	18.7
fotosensibilidad	3	18.7
úlceras orales	2	12.5
úlceras digitales	1	6.2
edema en manos	14	87.5
esclerodactilia	12	75.0
esclerosis cutánea difusa	8	50.0
telangiectasias	7	43.7
vasculitis cutánea	4	25.0
calcinosis	1	6.2
fenómeno de Raynaud	16	100
heliotropo	1	6.2
miopatía	10	62.5
síndrome de Sjögren	3	18.7
hipomotilidad esofágica	5	31.

Tabla 29.- Hallazgos clínicos en 16 pacientes con enfermedad mixta del tejido conectivo (II).

	n	%
pericarditis	1	6.2
pleuritis	1	6.2
enfermedad intersticial pulmonar	7	43.7
hematuria	3	18.7
proteinuria/cilindruria	1	6.2
anemia	3	18.7
leucopenia	4	25.0
linfopenia	1	6.2
trombopenia	2	12.5
hipergammaglobulinemia	14	87.5
ANA positivo (IFI)	16	100
factor reumatoide positivo	12	75.0
Ac anti-ADN nativo	5	31.2
hipocomplementemia	5	31.2

IFI: inmunofluorescencia indirecta.

Tabla 30.- Hallazgos clínicos en 21 pacientes con síndrome de Sjögren primario.

	n	%
artralgias	14	66.6
artritis	5	23.8
fenómeno de Raynaud	2	9.5
afección pulmonar	6	28.5
afección neurológica	5	23.8
tumefacción parotídea	8	38.0
vasculitis cutánea	4	19.0
anemia	5	23.8
leucopenia	7	33.3
hipergammaglobulinemia	8	38.0
AAN positivo (IFI)	16	76.1
factor reumatoide positivo	15	71.4
anti-Ro/SS A (CIE)	12	57.1

IFI: inmunofluorescencia indirecta, CIE: contrainmunolectroforesis.

Tabla 31.- Hallazgos clínicos en 275 pacientes con artritis reumatoide.

	n	%
erosiones articulares	230	83.6
pinzamientos articulares	247	89.8
grados radiológicos 3-4 *	113	41.0
grados funcionales 3-4 *	62	22.5
nódulos subcutáneos	71	25.8
síndrome de Sjögren	63	23.0
afección pulmonar	23	8.3
amiloidosis	9	3.2
proteinuria **	13	4.7
AAN positivo (IFI)	158	57.4
factor reumatoide positivo	211	76.7

\* Referencia 56, página 318.

\*\* no relacionada con fármacos.

**Tabla 32.- Hallazgos clínicos en 23 pacientes diagnosticados de conectivopatía no definida.**

	n	%
artralgias	4	17.3
artritis	12	52.1
alopecia	2	8.6
úlceras orales	5	21.7
livedo reticularis	2	8.6
telangiectasias	2	8.6
fenómeno de Raynaud	3	13.0
miopatía	1	4.3
polineuritis	1	4.3
enfermedad intersticial pulmonar	1	4.3
accidente cerebrovascular	1	4.3
citopenia	4	17.3
hipergammaglobulinemia	4	17.3
AAN positivo (IFI)	15	65.2
factor reumatoide positivo	11	47.8
otros Ac (*)	4	17.3

(\*) 1 anticuerpos antimitocondriales, 1 anticuerpos anticentrómero, 1 anticuerpos anti-ADN nativo y 1 anticuerpos anti-células parietales gástricas.  
IFI: inmunofluorescencia indirecta.

**Anexo 1.- Protocolo clínico**

---

Fecha de nacimiento:                      sexo:                      nombre:  
Fecha inicio de enfermedad:                      Nº historia:                      Tfno:  
Manifestaciones iniciales:  
A. Familiares:

---

**Articular:** artralgias                      artritis                      rigidez matutina                      nódulos  
                    subcutáneos                      erosiones                      pinzamientos                      subluxación  
                    anquilosis coxitis                      cervical                      grado radiológico  
                    grado funcional

**Cutáneo:** rash discoide                      rash mariposa                      alopecia  
                    fotosensibilidad                      aftas                      vasculitis                      púrpura  
                    edema dorso manos                      esclerodermia                      difusa  
                    esclerodactilia                      telangiectasias                      calcinosis                      Raynaud

**SS:** ojo                      Schirmer                      Rosa Bengala                      boca                      gammagrafía  
                    biopsia

**Esófago:** disfagia                      hipomotilidad

**Pulmón:** disnea                      pleuritis                      radiología                      disminución DLCO  
                    espirometría

**Corazón:** pericarditis                      miocarditis                      valvulopatía                      ECG

**Sist.nervioso:** central  
                    periférico

---

**Anexo 2.- Protocolo clínico**

---

**Hígado:** hepatomegalia                      transaminasas / fosfatasa alcalina  
                    biopsia

**Riñón:** leucocituria                      microhematuria                      cilindros                      proteinuria  
                    Creatinina plasmática >1.4                      biopsia                      HTA

**Músculo:** miositis                      CPK                      electromiografía  
                    biopsia

**Abortos:** número

**Infecciones:**

**Tiroides:**

**Hematología:** anemia                      coombs                      leucopenia                      trombopenia  
                    linfopenia                      hipergammaglobulinemia

**Inmunología:**

**ANA:**                      patrón:                      anti-ENA                      factor reumatoide

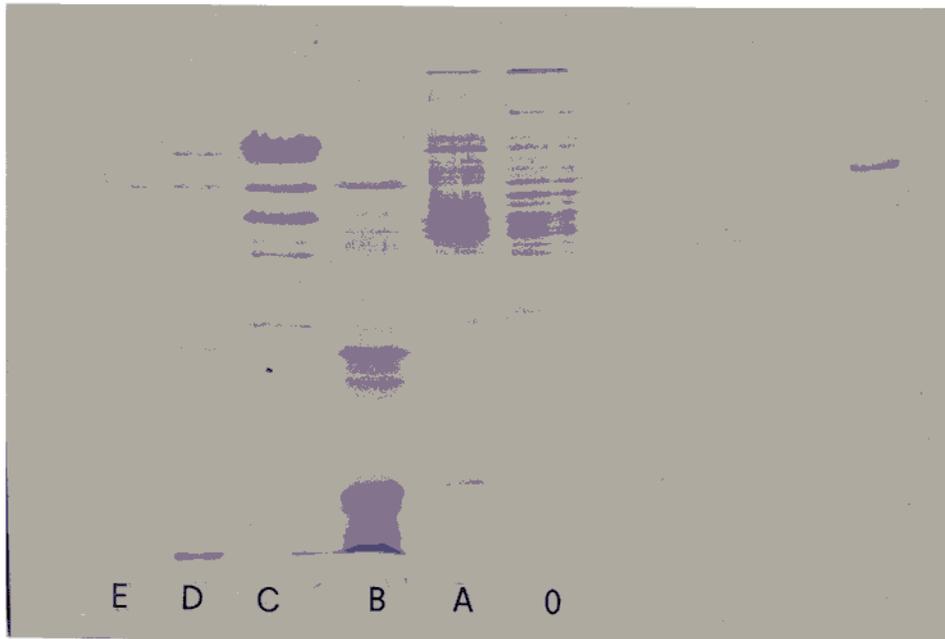
**otros anticuerpos:**                      C3/C4:

---

**Tratamientos:**

**E. 2º:**

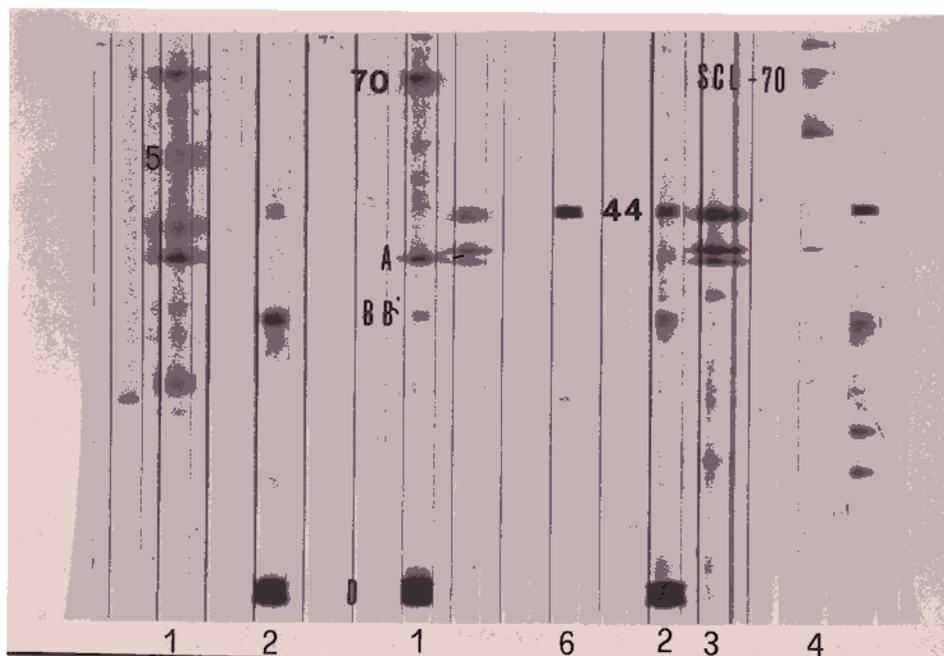
---

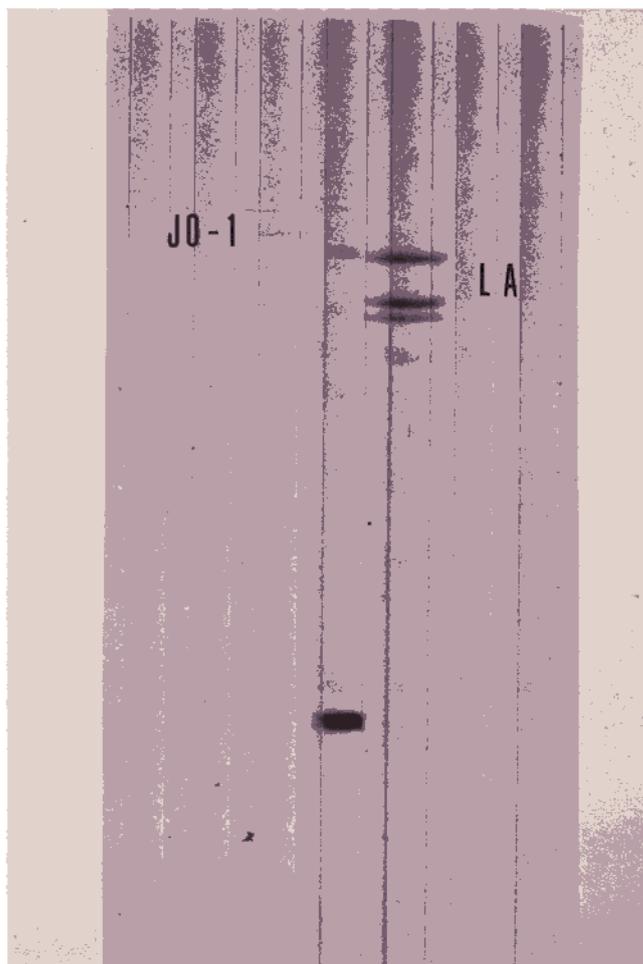


**Figura 1.-** Gel de poliacrilamida 18%. Tinción con azul coomasie.  
A y 0=extractos de leucocitos humanos.  
B=extracto de timo de conejo.  
C=extracto de placenta humana.  
D=marcadores de peso molecular  
E=albúmina bovina.

**Figura 2.-** Patrones de anticuerpos con extracto de timo de conejo (I).

- 1.- anticuerpos anti-RNP (70Kd,A,c).
- 2.- anticuerpos anti-Sm (BB',D).
- 3.- anticuerpos anti-La.
- 4.- anticuerpos anti-Scl70.
- 5.- anticuerpos anti-58Kd.
- 6.- anticuerpos anti-44 Kd.

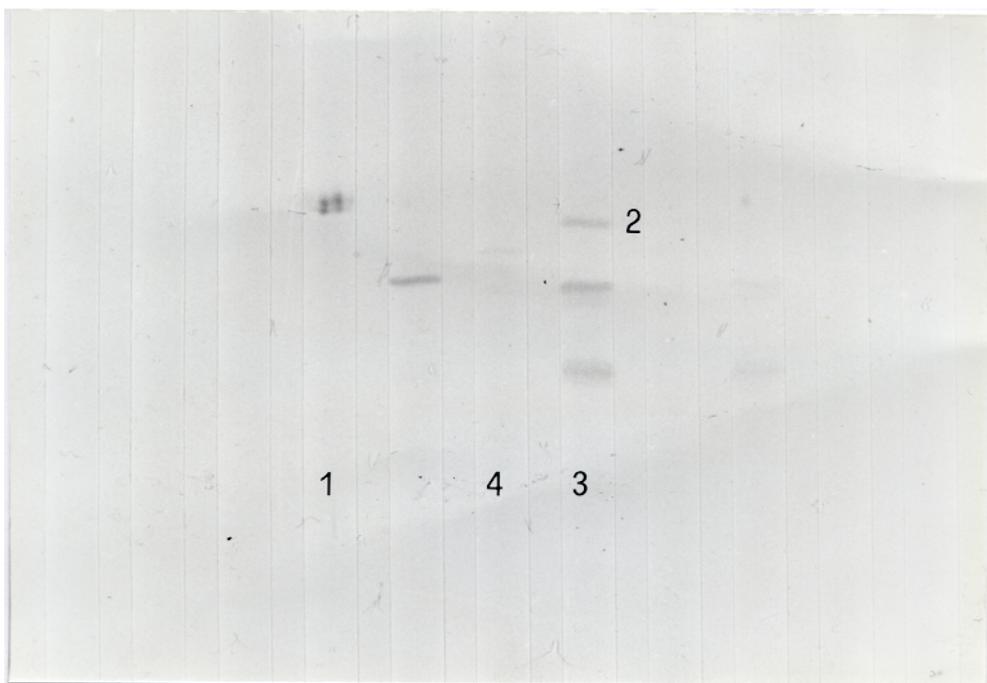




**Figura 3.-** Patrones de anticuerpos con extracto de timo de conejo (II).  
1.- anticuerpos anti-Jo1.  
2.- anticuerpos anti-La.

**Figura 4.-** Patrones de anticuerpos reconocidos con extracto de placenta humana.

- 1.- anticuerpos anti-Ro 60Kd.
- 2.- anticuerpos anti-Ro 52Kd.
- 3.- anticuerpos anti-La.
- 4.- anticuerpos anti-Sa.



## BIBLIOGRAFIA

- 1.-Sharp GC, Irwin WS, Tan WM, Gould RG, Holman HR: Mixed connective tissue disease: an apparently distinct rheumatic disease syndrome associated with a specific antibody to an extractable nuclear antigen (ENA). *Am.J.Med.* 1972;52:148-152.
- 2.-López-Longo FJ, Gutiérrez Martín C: Anticuerpos dirigidos contra antígenos nucleares extraíbles: caracterización y significado clínico. *LAB* 2000 1988;17:21-32.
- 3.-Lerner MR, Steitz JA: Antibodies to small nuclear RNAs complexed with protein are produced by patients with systemic lupus erythematosus. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 1977;76:5495-5499.
- 4.-Lerner MR, Boyle JA, Hardin JA, Steitz JA: Two novel classes of small ribonucleoproteins detected by antibodies associated with lupus erythematosus. *Science* 1981;211:400-402.
- 5.-Kurata N, Tan EM: Identification of antibodies to nuclear acidic antigen by counterimmunoelectrophoresis. *Arthritis Rheum.* 1976;19:574-578.
- 6.-Van Venrooij WJ, Habets WJ: Detection of nuclear antigens recognized by human autoantibodies. *Scan.J.Rheumatol.* 1985;56:32-41.
- 7.-Elkon KB, Jankowski PW: Fine specificities of autoantibodies directed against the Ro, La, Sm, RNP and Jo-1 proteins defined by two-dimensional gel electrophoresis and immunoblotting. *J.Immuno.* 1985;134:3819-3824.
- 8.-Maddison PJ, Skinner RP, Vlachogiannopoulos P, Brennan DM, Hough D: Antibodies to nRNP, Sm, Ro (SSA) and (SSB) detected by ELISA: Their specificity and interrelations in connective tissue disease sera. *Clin.Exp.Immunol.* 1985;6:337-345.
- 9.-Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-685.
- 10.-Towbin H, Stachelin T, Gordon J: Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 1979;76:4350-4355.
- 11.-Burnette WN: "Western-blotting" electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radiolabeled protein A.

Ann.Biochem. 1981;112:195-203.

- 12.-Habets WJ, De Rooij DJ, Saden MH et al: Antibodies against distinct nuclear matrix proteins are characteristic for mixed connective tissue disease. Clin.Exp.Immunol. 1983;54:265-272.
- 13.-Pettersson I, Wang C, Smith EI et al: The use of immunoblotting and immunoprecipitation of (U) small nuclear ribonucleoproteins in the analysis of sera of patients with mixed connective tissue disease and systemic lupus erythematosus: A cross sectional, longitudinal study. Arthritis Rheum. 1986;29:986-990.
- 14.-Boire G, López-Longo FJ, Lapointe S, Ménard HA: Sera from patients with autoimmune disease recognize conformational determinants on the 60Kd Ro/SSA protein. Arthritis Rheum. 1991;34:722-730.
- 15.-De Rooij DJ, Van de Putte LB, Habets WJ et al: The use of immunoblotting to detect antibodies to nuclear and cytoplasmic antigens. Scand.J.Rheumatol. 1988;17:353-364.
- 16.-Tan EM: Autoantibodies to nuclear antigens (ANA): Their immunobiology and medicine. Adv.Immunol. 1982;33:167-240.
- 17.-Tan EM: Antinuclear antibodies: Diagnostic markers for autoimmune diseases and probes for cell biology. Adv.Immunol. 1989;44:93-151.
- 18.-Tan EM, Kunkel HG: Characteristic of a soluble nuclear antigen precipitating with sera of patients with systemic lupus erythematosus. J.Immunol. 1966;96:464-471.
- 19.-Mattioli M, Reichlin M: Characterization of a soluble nuclear ribonucleoprotein antigen reactive with SLE sera. J.Immunol. 1971;107:1281-1290.
- 20.-Mattioli M, Reichlin M: Physical association of two nuclear antigens and mutual occurrence of their antibodies: the relationship of the Sm and RNP protein (Mo) systems in systemic lupus erythematosus sera. J.Immunol. 1973;110:1318-1324.
- 21.-Hinterberger M, Pettersson I, Steitz JA: Isolation of small nuclear ribonucleoproteins containing U1, U2, U4, U5 and U6-RNA's. J.Biol.Chem. 1983;258:2064-2613.
- 22.-Clark GM, Reichlin M, Tomasi B: Characterization of a soluble cytoplasmic antigen reactive with sera from patients with systemic lupus erythematosus. J.Immuno. 1969;102:117-122.
- 23.-Mattioli M, with sera of patients with systemic lupus erythematosus. Description of cytoplasmic non-ribosomal antigen. Arthritis Rheum. 1974;17:421-429.

- 24.-Alspaugh MA, Tan EM: Antibodies to cellular antigens in Sjögren Syndrome. *J.Clin.Invest.* 1975;55:1067-1073.
- 25.-Alspaugh MA, Talal N, Tan EM: Differentiation and characterization of autoantibodies and their antigens in Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* 1976;19:216-222.
- 26.-Alspaugh MA, Maddison P: Resolution of the identity of certain antigen-antibody systems in systemic lupus erythematosus and Sjögren's syndrome: an interlaboratory collaboration. *Arthritis Rheum.* 1979;22:796-798.
- 27.-Akizuki M, Powers R, Holman HR: A soluble acidic protein of the cell nucleus which reacts with serum from patients with systemic lupus erythematosus and Sjögren's syndrome. *J.Clin.Invest.* 1977;59:264-271.
- 28.-Hendrick JP, Wolin SL, Rinke J, Lerner MR, Steitz JA: Ro small cytoplasmic ribonucleoproteins are a subclass of La-ribonucleoprotein: Further characterization of the Ro and La small ribonucleoproteins from uninfected mammalian cells. *Med.Cell.Biol.* 1981;1:1138-1149.
- 29.-Wolin SL, Steitz JA: The Ro small cytoplasmic ribonucleoproteins: Identification of the antigenic protein and its binding on the Ro-RNAs. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 1984;81:1996-2001.
- 30.-Elkon KB, Culhane L: Partial immunochemical characterization of the Ro and La proteins using antibodies from patients with the sicca syndrome and lupus erythematosus. *J.Immunol.* 1984;132:2350-2356.
- 31.-Boire G, López-Longo FJ, Ménard HA: Western-blotting of anti-Ro (SS-A) positive sera reveals at least two subsets. *Arthritis Rheum* 1987;30(4):S 46 (abstr. A 53).
- 32.-Rader MD, O'Brien C, Lien Y, Harley JB, Reichlin M: Heterogeneity of the Ro/SS A antigen: Different molecular forms in lymphocytes and red blood cells. *J.Clin.Invest.* 1987;83:1293-1298.
- 33.-Ben-Chetrit E, Chan EKL, Sullivan KF, Tan EM: A 52-Kd protein is a novel component of the SS A/Ro antigenic particle. *J.Exp.Med.* 1988;162:1560-1571.
- 34.-Deng JS, Sontheimer RD, Gilliam JM: Molecular characteristics of SS B/La and SS A/Ro cellular antigens. *J.INvest.Dermatol.* 1985;84:86-90.
- 35.-Herrera-Esparza R, Provost TT, Díaz LA: Molecular characterization of Ro (SS A) and La (SS B) proteins. *J.Rheumatol.* 1986;13:327-330.
- 36.-Maddison PJ, Provost TT, Reichlin M: Serological findings in patients with "ANA-negative" systemic lupus

erythematosus. *Medicine* 1981;60:87-94.

- 37.-Southeimer RD, Maddison PJ, Reichlin M, Gordon RE, Stastny P, Gilliam JN: Serologic and HLA-associations in subacute cutaneous lupus erythematosus, a clinical subset of pupus erythematosus. *Ann.Intern.Med.* 1982;97:664-672.
- 38.-Provost TT, Arnett FC, Reichlin M: Homozygous C2-deficiency lupus erythematosus and anti-Ro (SS A) antibodies. *Arthritis Rheum.* 1983;26:1279-1282.
- 39.-Franco HL, Weston WL, Peebles C, Forstot SL, Phanupa KP: Autoantibodies directed against sicca syndrome antigen in the neonatal lupus erythematosus. *J.Am.Acad.Dermato.* 1981;4:67-72.
- 40.-Kephart DC, Hood AF, Provost TT: Neonatal lupus erythematosus: new serologic findings. *J.Invest.Dermatol.* 1981;77:331-333.
- 41.-Donvas AS, Achten M, Tan EM: Identification of a nuclear protein (Scl-70) as a unique target of human antinuclear antibodies in Scleroderma. *J.Biol.Chem.* 1979;254:10514-10522.
- 42.-Shero JH, Bordweel B, Rothfield NF, Earnshaw WC: High titres of autoantibodies to topoisomerase I (Scl-70) in sera from scleroderma patients. *Science* 1986;231:737-740.
- 43.-Bernstein RM, Morgan SH, Chapman J, et al: Anti-Jol. A marker for myositis with interstitial lung disease. *Br.Med.J.* 1984;1:151-152.
- 44.-Mathews MB, Bernstein RM: Myositis autoantibodies inhibits histidyl-t-RNA synthetase: a model for autoimmunity. *Nature* 1983;304:177-179.
- 45.-Weill BJ, Job-Deslandre C, Monkes CJ, Amor B: Etude des autocorps spécifiques des antigènes nucléaires solubles au cours de vascularites autoimmunes. *Rev.Rhum.* 1987;54:453-456.
- 46.-Van Venrooij WJ, Charles P, Maini RN: The consensus workshops for the detection of autoantibodies to intracellular antigens in rheumatic diseases. *J.Immunol. Methods* 1991;140:181-189.
- 47.-Ohmsted JB: Affinity purification of antibodies from diazotized pap blots of heterogeneous protein samples. *J.Biol.Chem.* 1981;256:11955-11957.
- 48.-Smith BJ: SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis of proteins. In "Walker JM" (ed) *Methods in molecular biology*. Vol 1, p 41-55, Humana Press, Clifton, New Jersey, 1984.

- 49.-Kaufmann SH, Ewing CM, Shaper JH: The erasable western-blot. *Anal.Biochem.* 1987;161:89-95.
- 50.-Tan EM, Cohen AS, Fries JF et al: The 1982 revised criteria for the classification of Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1982;25:1271-1277.
- 51.-Arnetrt FC, Edworthy SM, Bloch DA et al: The ARA 1987 revised criteria for the classification of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum.* 1988;31:315-324.
- 52.-Masi AT, Rodnan GP, Medsger TA et al: Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum.* 1980;23:581-590.
- 53.- Bohan A, Peter JB: Polymyositis and dermatomyositis. *N. Engl.J.Med.* 1975;292:344-347.
- 54.-Fox RI, Robinson CA, Curd JG, Kozin F, Howell FV: Sjögren's Syndrome. Proposed criteria for classification. *Arthritis Rheum.* 1986;29:577-585.
- 55.-Kasukawa R, Tojo T, Miyawachi S et al: Preliminary diagnostic criteria for classification of mixed connective tissue disease. In "Kasukawa R. Sharp GC" (eds) *Mixed Connective Tissue Disease and Antinuclear Antibodies.* *Excepta Medica* p 41-47, Elsevier, Amsterdam, 1987.
- 56.-Rodnan GP, Schumacher HR (eds) *Primer on the Rheumatic Disease, Eighth edition,* The Arthritis Foundation, Atlanta, 1989.
- 57.-Kelley WN, Harris ED, Ruddy S, Sledge CB (eds). *Testbook of Rheumatology, Third edition,* WB Saunders Company, Philadelphia 1989.
- 58.-Tan EM, Feltkamp TEW, Alarcón-Segovia D et al: Reference reagents for antinuclear antibodies. *Arthritis Rheum.* 1988;31:1331.
- 59.-Fleiss JL: *Statistical Methods for rates and proportions,* Wiley, New York, 1981.
- 60.-Hardin JA: The lupus autoantigens and the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1986;29:457-460.
- 61.-Anderson JR, Gray KG, Beck J, Kinnear WF: Precipitating autoantibodies in Sjögren's disease. *Lancet* 1961;2:456-457.
- 62.-Holman HR: Partial purification and characterization of an ENA which react with systemic lupus erythematosus sera. *Ann.NY.Acad.Sci.* 1965;114:800-806.

- 63.-Reichlin M, Mattioli M: Correlation of a precipitin reaction to and RNA-protein antigen and low prevalence of nephritis in patients with systemic lupus erythematosus. *N.Engl.J.Med.* 1972;286:908-911.
- 64.-Northway JO, Tan EM: Differentiations of antinuclear antibodies giving speckled staining patterns in immunofluorescence. *Clin. Immunol.Immunopathol.* 1972;1:140-154.
- 65.-Busch H, Reddy R, Rothblum L, Choi YE: SnRNAs, snRNPs and RNA processing. *Ann.Rev.Biochem.* 1982;51:617-619.
- 66.-Brunel C, Sri-Widada J, Jeanteur P: SnRNPs and scRNPs in eucaryotic cells. *Progr.Mol.Subcell.Biol.* 1985;9:1-52.
- 67.-White PJ, Hoch SO: Definition of the antigen polypeptides in the Sm and RNP-antiRNP complexes. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1981;102:365-371.
- 68.-Takano M, Agris PF, Sharp GC: Purification and biochemical characterization of nuclear ribonucleoprotein antigen using purified antibody from serum of a patient with mixed connective tissue disease. *J.Clin.Invest.* 1980;65:1449-1450.
- 69.-Habets W, De Rooij D, Hoet M, Van de Putte L, Van Venrooij V: Quantification of anti'RNP and anti-Sm antibodies in mixed connective tissue disease and systemic lupus erythematosus by immunoblotting. *Clin.Exp.Immunol.* 1985;59:457-466.
- 70.-Pettersson I, Hinterberger M, Mimori T, Gottlieb E, Steitz JA: The structure of mammalian snRNP: identification of multiple protein components reactive with anti-(U1)-RNP and anti-Sm autoantibodies. *J.Biol.Chem.* 1984;259:5907-5914.
- 71.-Habets WJ, Berden JH, Hoch SO, Van Venrooij WJ: Further characterization and subcellular localization of Sm and U1-RNP antigens. *Eur.J.Immunol.* 1985;15:992-997.
- 72.-Tsay G, Chan EKL, Peebles CL, Pollard KM, Tan EM: An immunoassay differentiating sera with antibodies to Sm alone, antibodies to Sm/RNP complex and antibodies to RNP alone. *Arthritis Rheum.* 1987;30:387-396.
- 73.-Buchanan RRC, Venables PJW, Morgan A, Staines NA, Smith PR, Maini RN: Separation of two molecular species of the Sm antigen by affinity chromatography with murine monoclonal and human antinuclear autoantibodies. *Clin.Exp.Immunol.* 1983;51:8-16.
- 74.-Maddison P, Mogavero H, Provost TT, Reichlin M: The clinical significance of autoantibodies to a soluble cytoplasmic antigen in systemic lupus

- erythematosus and other connective tissue diseases. J.Rheumatol. 1979;6:189-195.
- 75.-Scopelitis E, Biundo JJ: Inconsistent staining of HEp-2 cells with anti-SSA antibodies. Arthritis Rheum. 1984;27:1318-132.
- 76.-Harmon CE, Deng JS, Peebles CL, Tan EM: The importance of tissue substrate in the SS-A/Ro antigen-antibody system. Arthritis Rheum. 1984;27:166-173.
- 77.-Wermith DJ, Geoghegan WB, Jordon RE: Anti-Ro/SSA antibodies association with a particulate (large speckled-likethread) immunoflorescence nuclear staining pattern. Arch.Dermatol. 1985;121:335-338.
- 78.-Lerner MR, Steitz JA: Smurps and Syrps. Cell 1981;25:298-300.
- 79.-Lerner MR, Andrews NC, Miller G, Steitz JA: Two small RNP encoded by EBV and complexed with proteins are precipitated by antibodies fro patients with systemic lupus erythematosus. Proc.Natl.Acad.Sci. USA 1981;78:805-809.
- 80.-Madore SJ, Wieben ED, Pederson T: Eukaryotic small ribonucleoproteins, Anti-La human autoantibodies react with U1-RNA-protei complexes. J.Biol.Chem. 1984;259:1929-1933.
- 81.-McNeillage LJ, Whittingham S, Mackay IR: Autoantibodies reactive with snRNPs antigens: a convergence of molecular biology and clinical immunology. J.Clin.Lab.Immunol. 1984;15:1-17.
- 82.-McNeillage LJ, Whittingham S, Jack I, McKay IR: Molecular analysis of the RNA and protein components recognized by anti-La (SS-B) antibodies. Clin.Exp.Immunol. 1985;62:685-695.
- 83.-Kurilla MG, Keene JD: The leader RNA of vesicular stomatitis virus is bound by a cellular protein reactive with anti-La lupus antibodies. Cell 1983;34:837-845.
- 84.-Rinke J. Steitz JA: Precursor molecules of both human 5s ribosomal RNA and transfer RNAs are bound by a cellular protein reactive with anti-La lupus antibody. Cell 1982;29:149-159.
- 85.-Reddy R, Heuning D, Tan EM, Busch H: Identification of a La protein binding site in a RNA-polymerase III transcript (4.51RNA). J.Biol.Chem 1983;258:8352-9356.
- 86.-Chambers JC, Kurilla MG, Keene JD: Association between the 7s RNA and the lupus La protein varies among cell

- types. *J.Biol.Chem.* 1983;258:11438-11441.
- 87.-Chan EKL, Francoeur AM, Tan EM: Epitopes, structural domains and asymmetry of aminoacid residues in SS-B/La nuclear protein. *J.Immunol.* 1986;136:3744-3749.
- 88.-Bini P, Chu JL, Okolo C, Elkon K: Analysis of autoantibodies to recombinant La (SS-B) peptides in systemic lupus erythematosus and primary Sjögren's Syndrome. *J.Clin.Invest.* 1990;85:325-333.
- 89.-Kato N, Hoshino H, Harada F: Nucleotide sequence of 4.55 RNA (c8 or hy5) from HeLa cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun* 1982;108:363-370.
- 90.-Wolin SL, Steitz JA: Genes for two small cytoplasmic Ro-RNAs are adjacent and appear to be single-copy in the human genome. *Cell* 1983;32:735-744.
- 91.-Reichlin M, Rader MD, Harley JB: The autoimmune response to the Ro (SS-A) particle is directed to the human antigen. *Clin.Exp.Immunol.* 1989;76:373-377.
- 92.-Lien TS, Jiang M, Steigerwald JC, Tan EM: Identification of SS-S/Ro intracellular antigen with autoimmune sera. *J.Immunol.Methods.* 1984;71:217-228.
- 93.-Yamagata H, Harley JB, Reichlin M: Molecular properties of the Ro/SS A antigen and ELISA for quantitation of antibodies. *J.Clin.Invest.* 1984;74:625-633.
- 94.-Itoh Y, Rader MD, Reichlin M: Heterogeneity of the Ro (SS A) antigen and the autoanti-Ro (SS A) response: evidence for 4 antigenically distinct forms. *Arthritis Rheum.* 1989;32(4):S27(abstr. A89).
- 95.-Itoh Y, Rader MD, Reichlin M: Heterogeneity of the Ro/SS A antigen and autoanti-Ro/SS A response: evidence for 4 antigenically distinct forms. *Clin. Exp.Immunol.* 1990;81:45-51.
- 96.-Rader M, O'Brien C, Harley JB, Liu Y, Reichlin M: Heterogeneity of the Ro/SS A antigen: different molecular forms in lymphocytes and red blood cells. *J.Clin.Invest.* 1989;83:1293-1298.
- 97.-Itoh K, Itoh Y, Frank MB: Protein heterogeneity in the human Ro/SS A ribonucleoproteins. The 52- and 60-KD Ro/SSA autoantigens are encoded by separate genes. *J.Clin.Invest.* 1991;87:177-186.
- 98.-Itoh Y, Itoh K, Frank MB, Reichlin M: The 42 Kd Ro/SSA bind a subpopulation of antibodies to the native 60 Kd Ro/SSA protein: evidence that hYRNA's are not associated with 52 Kd Ro/SS A. *Arthritis Rheum.* 1991;34(9):S 46

(abstr.80).

- 99.-Monast N, Gendrom M, Ménard HA, Boire G: 52 Kd Ro protein in biochemically purified human Ro-RNPs. Arthritis Rheum. 1991;34(9): S 46 (abstr.79).
- 100.-Lieu Ts, McCauliffe DP, Volpe P et al: Structural and functional homology between a human Ro/SS-A autoantigen and the calcium binding protein, clareticulin. 54th. Annual Meeting ACR, Oct 27-Nov 1, Seattle, Washington, 1990.
- 101.-MacCauliffe DP, Zappi E, Lieu Ts, Michalak M, Sontheimer RD, Capra JD: A human Ro/SSA autoantigen is the homologue of careticulin and is highly homologous with onchocercal RAL-1 antigen and an Aphysia "Memory Molecule". J.Clin.Invest. 1990;86:332-335.
- 102.-Provost TT, Ahmed RR, Maddison P, Reichlin M: Antibodies to cytoplasmic antigens in lupus erythematosus-Serologic amrkers for systemic disease. Arthritis Rheum. 1977;20:1457-1463.
- 103.-Reichlin M, Harley JB: ANA subsets in systemic lupus erthematosus. In "Smolen JS, Sielinski CC" (eds). Systemic Lupus Erythematosus: Clinical and experimental aspects, p 103-123, Springer-Verlag, Berlin, 1987.
- 104.-Eisenberg RA: Association between the Ro and La antigenic determinants: immunodiffusion analysis of human spleen extract. J.Immunol. 1985;135:1707-1713.
- 105.-Stefano JE: Purified lupus antibody recognizes an oligouridyla stretch common to the 3'termini of RNA polymerase III transcripts. Cell 1984;36:145-154.
- 106.-Reichlin M, Mattioli M: Description of a serological reaction characteristic of polymyositis. Clin.Immunol.Immunopathol. 1976;5:12-21.
- 107.-Nishikai N, Reichlin M: Heterogeneity of precipitating antobodies in polymyositis and dermatomyositis. Characterization of the Jo-1 antibody system. Arthritis Rheum. 1980;23:881-888.
- 108.-Rosa MD, Hendrick JP, Lerner MR, Steitz JA, Reichlin M: A mammalian t-RNA his. containing antigen is recognized by the polymyositis-spceific antibody anti-Jo-1. Nucleic.Acid.Res. 1983;11:853-869.
- 109.-Targof IN, Reichlin M: Measurement of antibodies to Jo-1 by ELISA and comarison to enzyme inhibitory activity. J.Immunol. 1987;138:2874-2882.
- 110.-Tan EM, Rodnan GP: Profile of antinuclear antibodies in progressive systemic sclerosis. Arthritis Rheum.

1975;18:430.

- 111.-Maul GG, French BT, Van Venrooij WJ, Jiménez SA: Topoisomerase I identified by scleroderma-70 antisera: Enrichment of topoisomerase I at the centromere in mouse mitotic cells before anaphase. Proc.Natl.Acad.Sci. USA 1986;83:5145-5149.
- 112.-Guldner HH, Szostecki C, Vosberg HP, Lakomek HJ, Penner E, Bautz FA: Scl-70 autoantibodies from scleroderma patients recognize a 95 Kd protein identified as DAN-topoisomerase I. Chromosoma 1986;94:132-138.
- 113.-Van Venrooij WJ, Stapel SO, Houben H et al: Scl-86, a marker antigen for diffuse scleroderma. J.Clin.Invest. 1985;75:1053-1060.
- 114.-Kumar V, Kowlewski C, Koelle M et al: Scl-70 antigen stability and its effect on antibody detection in scleroderma. J.Rheumatol. 1988;15:1499-1502.
- 115.-Forman MS, Nakamura M, Mimori T, Gelpi C, Hardin JA: Detection of antibodies to snRNPs and scy RNPs using unlabeled cell extracts. Arthritis Rheum. 1985;28:1356-1361.
- 116.-Hines JJ, Danho W, Elkon KB: Detection and quantitation of human anti-Sm antibodies using synthetic peptides and recombinant Sm B antigens. Arthritis Rheum. 1991;34:572-579.
- 117.-Southern EM: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J.Mol.Biol. 1975;98:503-507.
- 118.-Alwine JC,, Kemp DJ, Stark GR: Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. Proc.Natl.Acad.Sci. USA 1977;74:5350-5358.
- 119.-Hames BD: An introduction to polyacrylamide gel electrophoresis. In "Hames BD, Rickwood D" (eds). Gel electrophoresis of proteins. A practical approach, 1-91, IRL Press, Oxford, 1981.
- 120.-Allen RC, Sarans CA, Maurer HR: Gel electrophoresis and isoelectric focusing of proteins. Selected techniques, 1-62, Walter de Gruyter, Berlin, 1984.
- 121.-Slobbe RL, Pruijn GJM, Damen WGM, Van der Kemp JWCM, Van Venrooij WJ: Detection and occurrence of the 60 and 52Kd Ro (SS A) antigens and of autoantibodies against these proteins. Clin.Exp.Immunol. 1991;86:99-105.
- 122.-Weber K, Osborn M: The reliability of molecular weight determinations by dodecylsulfate-polyacrylamide gel

- electrophoresis. *J.Biol.Chem.* 1969;244:4406-4412.
- 123.-Liu W, Kasamatse H: On the electrotransfer of polypeptides from gels to nitrocellulose membranes. *Anal.Biochem.* 1983;128:302-306.
  - 124.-Van Dam AP, Van Den Brink HG, Smcenk RJT: Technical problems concerning the use of immunoblots for the detection of ANA. *J.Immunol.Methods* 1990;129:63-70.
  - 125.-Betteiger B, Newhall VWJ, Jones RB: The use of tween-20 a blocking agent in the immunological detection of proteins transferred to nitrocellulose membranes. *J.Immunol.Methods* 1982;55:297-307.
  - 126.-Hoffman WL, Jump AJ: Tween-20 removes antibodies and other proteins from nitrocellulose. *J.Immunol.Methods* 1986;94:191-196.
  - 127.-Van Oss CJ, Good RJ, Chandlury MK: Mechanism of DAN (Southern) and protein (Western) blotting on cellulose nitrate and other membranes. *J.Chromatogr.* 1987;391:53-56.
  - 128.-Rokeach LA, Jannatipour M, Hoch SO: Heterologous expression and epitope mapping of a human snRNP-associated Sm-BB' autoantigen. *J.Immunol.* 1990;144:1015-1022.
  - 129.-Habets WJ, Hoet HH, Van Venrooij WJ: Epitope patterns of anti-RNP antibodies in rheumatic diseases. Evidence for an antigen-driven autoimmune response. *Arthritis Rheum.* 1990;33:834-841.
  - 130.-Scott DI: Autoantibodies and nuclear antigens. *Immunol.Today* 1985;6:314-315.
  - 131.-Combe B, Rucheton M, Graafland H, Lussiez V, Brunel C, Sany J: Clinical significance of anti-RNP and anti-Sm autoantibodies determined by immunoblotting and immunoprecipitation in sera from patients with connective tissue diseases. *Clin.Exp.Immunol.* 1989;75:18-24.
  - 132.-Shapiro PE, McAllister G, Lerner EA, Lerner MR: Healthy individuals and patients with SLE have unique, person-specific spectra of antibodies detectable on immunoblots. *Clin.Immunol.* 1991;59:129-138.
  - 133.-Whittingham S: SLE or MCTD and the Snurps in the splicing. *J.Rheumatol.* 1990;17:1260-1262.
  - 134.-Takeda Y, Wang GS, Wang RJ et al: ELISA using isolated (U)-snRNP polypeptides as antigen to investigate the clinical significance of autoantibodies to the polypeptides. *Clin.Immunol.Immunopathol.* 1989;50:213-230.

- 135.-Francoeur AM: Analysis of autoantibody specificities in selected systemic lupus erythematosus sera. J.Clin.Immunol. 1989;9:248-255.
- 136.-Elkon KB, Hines JJ, Chu JL, Parnassa AP: Epitope mapping of recombinant HeLa SmB and B' peptides obtained by the polymerase chain reaction. J.Immunol. 1990;45:636-643.
- 137.-Habets WJ, Sillekens PTG, Hoet MT, McAllister G, Lerner MR, Van Venrooij WJ: Small nuclear RNA-associated proteins are immunologically related as revealed by mapping of autoimmune reactive B-cell epitopes. Proc.natl.Acad.Sci. USA 1989;86:4674-4681.
- 138.-Sillekens PTG, Habets WJ, Beijer RP, Van Venrooij Wj: cDNA cloning of the human U1-snRNA-associated A protin: extensive homology between U1 and u2-snRNP-specific proteins. EMBO J. 1987;86;4674-4681.
- 139.-Sillekens PTG, Habets WJ, Van Venrooij WJ: Human U1-snRNP-specific C protein: complete cDNA and protein sequence and identification of a multigene family in mammals. Nucleic Acid Res. 1988;16:8307-8321.
- 140.-Yamamoto K, Miura H, Moroi Y et al: Isolation and characterization of a complementary DNA expressing human U1-snRNP polypeptide. J.Immunol. 1988;140:311-317.
- 141.-Hoffman RW, Retternhamier LJ, Takeda Y et al: Human autoantibodies against the 70Kd polypeptide of U1-snRNP are associated with HLA-DR4 among connective tissue disease patients. Arthritis Rheum. 1990;33:666-673.
- 142.-Habets WJA, Hoet MH, Sillekens PTG, De Rooij DJRAM, Van de Putte LBA, Van Venrooij WJ: Detection of autoantibodies in a quantitative immunoassay using recombinant RNP antigens. Clin.Exp.Immunol. 1989;76:172-177.
- 143.-Yasuma M, Takasaki Y, Matsumoto K, Kosama A, Hashimoto H, Hirose SI: Clinical significance of IgG-anti-Sm antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. J.Rheumatol. 1990;17:469-475.
- 144.-Van Venrooij WJ, Sillekens PTG: Sn-RNA associated proteins: autoantigens in connective tissue diseases. Clin.Exp.Rheumatol. 1989;7:635-645.
- 145.-Sharp GC, Alspaugh MA: Autoantibodies to nonhistone antigens: their immunobiology and clinical relevance .In "Gupta S, Talal N" (ed) Immunology of Reumatic Diseases, 197-219, Plenum, New York, 1986.
- 146.-Takano M, Golden S, Sharp GC, Agris PF: Molecular relationships between two nuclear antigens, RNP and Sm purification of active antigens and their biochemical

- characterization. *Biochemistry* 1981;20:5929-5936.
- 147.-Liautard JP, Sri-Widada J, Brunel C, Jeauteur P: Structural organization of RNPs containing snRNAs from HeLa cells. *J.Mol.Biol.* 1982;162:623-643.
  - 150.-Reichlin M: Diagnosis, criteria, serology. In "Schur PH" (ed). *The clinical management of systemic lupus erythematosus*, 49-61, Grune and Stratton, New York, 1983.
  - 151.-Kallenberg CGM, Wouda AA, Hoet MH, Van Venrooij WJV: Development of connective tissue disease in patients presenting with Raynaud's phenomenon: a six year follow-up with emphasis on the predictive value of ANA as detected by immunoblotting. *Ann.Rheum.Dis.* 1988;47:364-641.
  - 152.-Weiner Es, Hildebrandt S, Senecal JI et al: Prognostic significance of anticentromere antibodies and anti-topoisomerase I antibodies in Raynaud's disease. *Arthritis Rheum.* 1991;34:68-77.
  - 153.-Munves EF, Schur PH: Antibodies to Sm and nRNP: Prognosticators of disease involvement. *Arthritis Rheum.* 1983;26:848-853.
  - 154.-McHugh N, James I, Maddison P: Clinical significance of antibodies to a 68Kd a U1-RNP polypeptide in connective tissue disorders. *J.Rheumatol.* 1990;17:1320-1328.
  - 155.-Rasmussen EK, Ullman S, Höier-Madsen M, Söresen SF, Halberg P: Clinical implications of ribonucleoprotein antibodies. *Arch.Dermatol.* 1987;123:601-605.
  - 156.-Trotta A, Bendetti C, Natali G: Quantitative immunoassay using Sm B/B, gel purified in SLE. *Hungarian Rheumatology* 1991;32(Suppl): 206(abstr. FP34-346).
  - 157.-Scopelitis E, Pérez M, Brundo JJ: Anti-SSA (Ro) antibodies A connective tissue disease marker. *J.Rheumatol.* 1985;12:1105-1108.
  - 158.-Alzate C, Fonseca E, Pascual D et al: Significado clínico de los anticuerpos anti-SSA/Ro. *Actas dermasif.* 1987;78:646-660.
  - 159.-Merle SP, Krippener H: Anti-Ro antibodies in a population of German patients. *J.Rheumatol.* 1987;14:185-186.
  - 160.-Boire G, Ménard HA: Clinical significance of anti-Ro/SSA antibodies in Rheumatoid Arthritis. *J.Rheumatol.* 1988;15:391-394.
  - 161.-Nyman U, Lundberg I, Hedfors E, Petterson I: Recombinant 70Kd protein used for determination of autoantigenic

- epitopes recognized by anti-RNP sera. Clin. Exp. Immunol. 1990;81:52-58.
- 162.-Meyer O, Kuntz D, Kahm MF, Bourgeois P, Haim T: Characterisation par immunoempreinte (WB) des anticorps anti-RNP au cours de 36 connectivites donc 26 connectivites mixtes. Comparaison avec 28 malades lupiques avec anti-Sm. Rev.Rhum. 1988;55(3):188 (abstr.55).
- 163.-Koelle M, Kumar V: Heterogeneity of U1-RNP antibodies and their recognition of conformational epitopes. 51st Annual Meeting ARA. (abstr. A 107), June 9-13. Washington, DC, 1987.
- 164.-Meilof JF, Bantjes I, De Jong J, Van Dam AP, Smeenk RJ: The detection of anti-Ro/SS A and anti-La/SS B antibodies. A comparison of counterimmunoelectrophoresis with immunoblotting, ELISA and RNA-precipitation assay. J.Immunol, Methods 1990;133:215-226.
- 165.-James JA, Dickey WD, Fujisaku A et al: Antigenicity of a recombinant Ro (SS A) fusion protein. Arthritis Rheum. 1990;33:102-106.
- 166.-Rader MD, Coddling C, Reichlin M: Differences in the fine specificity of anti-Ro (SS A) in relation to the presence of their precipitating autoantibodies. Arthritis Rheum. 1989;32:1563-1571.
- 167.-Juby A, Johnston C, Davis P: Specificity sensitivity and diagnostic predictive value of selected laboratory generated autoantibody profiles in patients with connective tissue diseases. J.Rheumatol. 1991;18:354-358.
- 168.-Gioud M, Chamot AM, Bourgeois P, Mayer O, Kalm MF: Differences symptomatiques et pronostiques selon la communant;e ethnique dans le LES. Etude controlée sur trois populations. Presse Med. 1988;17:103-106.
- 169.-Maini RN, Charles DJ, Venables PJW: Antinuclear antibodies in the immunotaxonomy of connective tissue disorders. Scand.J.Rheumatol. 1985;56(Supl.): 49-57.
- 170.-Powers R, Akizuki M, Boelm-Truitt M, Doly V, Holman HR: Substantial purification of the Sm antigen and association of high titer antibodies to Sm with a clinical subset of lupus erythematosus. Arthritis Rheum. 1977;20:131-133.
- 171.-Sharp GC: Anti-RNP and anti-Sm antibodies. Arthritis Rheum. 1982;25:757-760.
- 172.-Tan EM, Robinson Ca, Nakamura RM: Antinuclear antibodies in systemic rheumatic diseases. Postgr.Med. 1985;78:141-148.

- 173.-Barakat S, Briand JP, Weber JC, Van Regenmortel MHV, Muller S: Recognition of synthetic peptides of Sm-'d autoantigen by lupus sera. Clin.Exp.Immunol. 1990;81:256-262.
- 174.-Peña JL, Riestra JL, Sánchez S, González-Gay MA, Gómez Reino J, Sampedro J: Significado clínico, analítico e histológico renal de los anticuerpos contra ENA en pacientes con LES. Rev.Esp.Reumatol. 1984;11:70-73.
- 175.-De Rooij DJ, Habets WJ, Stapel S, Van de Putte LB, Van Venrooij WJ: Clinical significance of antibodies against nuclear antigens as determined by immunoblotting. Scand.J.Rheumatol. 1985;56 (supl.):93-97.
- 176.-Williamson GG, Pennebaker J, Boyle JA: Clinical characteristic of patients with rheumatic disorders who possess antibodies against RNP particles. Arthritis Rheum. 1983;26:509-515.
- 177.-Bernstein RM, Munn CC, Hughes GRV, Francoeur AM, Mathews MB: Cellular proteins and RNA antigens in autoimmune disease. Mol.Biol.Med. 1984;2:105-120.
- 178.-Arnett FC, Hamilton RG, Roebber Mg, Harley JB, Reichliln M: Increased frequencies of Sm and nRNP autoantibodies in American black compared to whites systemic lupus erythematosus. J.Rheumatol. 1988;15:1773-1776.
- 179.-Winn DM, Wolfe JF, Lindberg DA, Fristoe FH, Kingsland L, Sharp GC: Identification of a clinical subset of systemic lupus erythematosus by antibodies to Sm antigen. Arthritis Rheum. 1977;22:1334-1337.
- 180.-Parker MD: RNP antibodies: Frequency and clinical significance in systemic lupus erythematosus, scleroderma and mixed connective tissue disease. J.Lab.Clin.Med. 1973;82:769-775.
- 181.-Dorsch CA, Feinglass EJ, Stevns MB: Clinical significance of antibodies to ENA in systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum. 1977;20:114-118.
- 182.-Barada FA, Andrews BS, Davis JS, Taylor RP: Antibodies to Sm in patients with systemic lupus erythematosus. Correlation of Sm antibodies titers with disease activity and other laboratory parameters. Arthritis Rheum. 1981;24:1236-1244.
- 183.-Beaufils M, Kouki F, Mignon F, Camus JP, Morel-Mauger L, Richet G: Clinical significance of anti-Sm antibodies in systemic lupus erythematosus. Am.J.Med. 1983;74:201-205.
- 184.-Field M, Williams DG, Charles P, Maini RN: Specificity of anti-Sm antibodies by ELISA for systemic lupus erythematosus: increased sensitivity of detection using

- purified peptide antigens. *Ann.Rheum.Dis* 1988;47:820-825.
- 185.-Jonsson J, Norberg R: Symptomatology and diagnosis in connective tissue disease. *Scand.J.Rheumatol.* 1978;75:229-236.
  - 186.-Hamburger M, Hodes S, Barland P: The incidence and clinical significance of antibodies to extractable nuclear antigens. *Am.J.Med.Sci.* 1977;273:21-28.
  - 187.-Notman DD, Kurata N, Tan EM: Profiles of antinuclear antibodies in systemic rheumatic diseases. *Ann.Intern.Med.* 1975;83:464-469.
  - 188.-Kurata N, Hara I, Kinashi M, Akita H, Ofujn T: The correlation of antibodies to nRNP and nuclear acidic protein (Sm) with nephritis in patients with systemic lupus erythematosus. *Contrib.Nephrol.* 1978;9:17-24.
  - 189.-Synkowski DR, Reichlin M, Provost TT: Serum autoantibodies in systemic lupus erythematosus and correlation with cutaneous features. *J.Rheumatol.* 1982;9:380-385.
  - 190.-Barland P, Hamburger M, Hodes S: The clinical significance of anti-Sm and anti-RNP antibodies. *Arthritis Rheum.* 1975;18:384-387.
  - 191.-Reinitz D, Grayzel A, Barland P: Specificity of Sm antibodies. *Arthritis Rheum.* 1980;23:869-871.
  - 192.-Neri R, Tartarelli G, D'Ascamo A et al: Anti-ENA antibodies in systemic lupus erythematosus: clinical - serological correlations. In "Peeters H" (ed). *Protides of the biological fluids*, 293-296, Pergamon Press, Oxford, 1985.
  - 193.-Rodriguez M, Mulero J, Gaspar ML, Noguera E, Marenco JL, Gutierrez C: Manifestaciones clínicas en pacientes con lupus eritematoso sistémico portadores de anticuerpos anti-ENA. *Rv.Esp.Reumatol.* 1985;12:6-9.
  - 194.-Winfield JB, Brunner CM, Koffler D: Serologic studies in patients with systemic lupus erythematosus and central nervous system dysfunction. *Arthritis Rheum.* 1978;21:289-294.
  - 195.-Barada FA, Andrews BS, Davis JS: Antibodies to Sm in patients with systemic lupus erythematosus: Correlation with disease activity. *Arthritis Rheum.* 1980;23:652-653.
  - 196.-Ter Borg EJ, Groen H, Horst G, Limburg Pc, Wouda AA, Kallenberg CGM: Clinical associations of antiribonucleoprotein antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *Semin.Arthritis. Rheum.* 1990;20:164-173.

- 197.-Lussiez V, Combe B, Graafland H, Rucheton M, Sany J: Anticorps anti-Sm et anti-RNP détectés par immunoempreinte du cours du LED. Rev. Rhum. 1988;55(3)188 (abstr. 54).
- 198.-Combe B, Lussiez V, Rucheton M, Graafland H, Brunel C, Sany J: Intérêt de la caractérisation des anticorps anti-RNP et anti-Sm par immunoempreinte et immunoprécipitation dans les connectivites. Rev. Rhum. 1988;55:47-49.
- 199.-Nakamura RM, Tan EM: Autoantibodies to non histone nuclear antigens and their clinical significance. Human Pathol. 1983;14:392-400.
- 200.-Cohen ML, Dawkins B, Dawkins RL, Owen EF: Clinical significance of antibodies to RNP. Ann. Rheum. Dis. 1979;38:74-78.
- 201.-Gaudreau A, Amor B, Kahn MF, Ryckevareert A, Sany J, Peltrier M: Clinical significance of antibodies to soluble extractable nuclear antigens (anti-ENA). Ann. Rheum. Dis. 1978;37:321-327.
- 202.-Grennan DM, Bunn C, Hughes GRV, Buchanan WW, Dick WC: Frequency and clinical significance of antibodies to RNP in systemic lupus erythematosus and other connective tissue subgroups. Ann. Rheum. Dis. 1977;36:442-447.
- 203.-Reichlin M: Problems in differentiating systemic lupus erythematosus and mixed connective tissue disease. N. Engl. J. Med. 1976;295:1194-1195.
- 204.-Nimelstein SH, Brody S, Meshane D et al: Mixed Connective Tissue Disease: A subsequent evaluation of the original 25 patients. Medicine 1980;59:239-248.
- 205.-Meyer O: Les autoanticorps dans les collagénosis. Ann. Med. Intern. 1986;137:606-678.
- 206.-Benhamou CL, Amor B, Menkes CJ, Delbarre F: Evolution des connectivites avec anticorps anti-RNP. Signification pronostique des anticorps anti-RNP chez 38 malades. Ann. Med. Interne 1982;133:72-79.
- 207.-Nishikai M, Okano Y, Mukohda Y, Sato A, Ito M: Serial estimation of anti-RNP antibodies titers in systemic lupus erythematosus, mixed connective tissue disease and rheumatoid arthritis. J. Clin. Lab. Immunol. 1984;13:15-19.
- 208.-Fritzler MJ, Kinsella TD, Garbutt E: The CREST syndrome: a distinct serologic entity with anticentromere antibodies. Am. J. Med. 1980;69:520-526.
- 209.-Cipoletti I, Buckingham RB, Leon-Barnes E et al: Sjögren's syndrome in progressive systemic sclerosis.

Ann.Intern.Med. 1977;87:535-538.

- 210.-Tan EM, Rodnan GP, Garcia I, Moroi Y, Fritzler MJ, Peebles : Diversity of antinuclear antibodies in progressive systemic sclerosis: Anticentromere antibodies and its relationship to CREST syndrome. Arthritis Rheum. 1980;23:617-625.
- 211.-Meyer O, Chabrand-Ahond L, Kahn MF, Ryckewaert A: Recherche des anticorps anti-antigènes nucléaires solubles SS-A, SS-B et RNP dans 66 cas de syndrome de Gougerot-Sjögren purs ou associés. Rev.Rhum. 1982;49:421-425.
- 212.-Aitchison CT, Peebles C, Joslin F, Tan EM: Characteristic of antinuclear antibodies in rheumatoid arthritis. Reactivity of rheumatoid factor with histone-dependent nuclear antigen. Arthritis Rheum. 1980;23:528-539.
- 213.-Velthuis PJ, Kater L, Ven der Tweel I et al: In vivo ANA of the skin: diagnostic significance and association with selective ANA. Ann.Rheum.Dis. 1990;49:163-167.
- 214.-St-Clair EW, Query CC, Pisetsky DS, Keene JD: Lupus sera frequently recognize cloned U1-RNP associated 70Kd fusion protein. Arthritis Rheum. 1988;31(4):S 64 (Abstr. B29).
- 215.-Reichlin M, Van Venrooij WJ: Autoantibodies to the U-RNP particles: relationship to clinical diagnosis and nephritis. Clin.Exp.Immunol. 1991;83:286-290.
- 216.-Sharp GC, Irwin WS, May CM et al: Association of antibodies to RNP and Sm antigens with mixed connective tissue disease, systemic lupus erythematosus and other rheumatic diseases. N.Engl.J.Med. 1976;295:1149-1154.
- 217.-Ramos-Niembro F, Alarcón-Segovia D, Hernández-Ortiz J: Articular manifestations of mixed connective tissue disease. Arthritis Rheum. 1979;22:43-51.
- 218.-Leibfarth JH, Persellin RH: characteristic of patients with serum antibodies to ENA. Arthritis Rheum. 1976;19:851-856.
- 219.-Lemmer JP, Curry NH, Mallory JH, Waller MV: Clinical characteristic and cause in patients with high titer anti-RNP antibodies. J.Rheumatol. 1982;9:536-542.
- 220.-Wolfe JK, Kingland L, Lundberg D et al: Disease pattern in patients with antibodies only to nRNP. Clin.Res. 1977;25:488A.
- 221.-Harmon D, Wolfe JF, Lillard S, Held C, Gordon R, Sharp GC: Pulmonary involvement in mixed connective tissue disease. Arthritis Rheum. 1976;19:801-809.

- 222.-Whitlow PL, Gilliam J, Chubieck A, Ziff M: Myocarditis in mixed connective tissue disease. *Arthritis Rheum.* 1980;23:808-815.
- 223.-Maddison Pj, Mogavero H, Reichlin M: Patterns of clinical disease associated with antibodies to nuclear nRNP. *J.Rheumatol.* 1978;5:407-411.
- 224.-Griffiths ID, Mumford P, Maini RN, Scott JR: Clinical significance of antibodies to EN. *Ann.Rheum.Dis.* 1977;36:479-481.
- 225.-McHugh NJ, Maddison PJ: Immunoblotting profiles in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1987;30(Suppl.):S 54 (abstr. A98).
- 226.-Piranien HI: Patients with arthritis and anti-U1-RNP antibodies: a 10-year follow-up. *Br.J.Rheumatol.* 1990;29:345-348.
- 227.-Westgeest AA, Van Den Brink HG, De Jong J, Swaak AJ, Smeenk RJ: Antinuclear antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. A comparison of counterimmunoelectrophoresis and immunoblotting. *Rheumatol.Int* 1987;27:77-82.
- 228.-Alexander EL, Arnett FC, Provost TT et al: Sjögren's syndrome associated with anti-Ro/SS A antibodies with vasculitis, hematologic abnormalities and serologic hyperreactivity. *Ann.Intern.Med.* 1983;98:155-159.
- 229.-Moutsopoulos HM, Giotaki H, Maddison PJ, Mavridis AC, Drosos AA, Skopouli FN: Antibodies to cellular antigens in Greek patients with autoimmune rheumatic diseases: anti-Ro/SS A antibody, a possible marker of penicillamine-D intolerance. *Ann.Rheum.dis.* 1984;43:285-287.
- 230.-Scopelitis E, Biundo JJ, Alspaugh MA: Anti-SSA antibodies and other ANA in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1980;23:287-293.
- 231.-Moutsopoulos HM, Klippel JH, Pavlidis N et al: Correlation histologic and serologic findings of sicca syndrome in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis.Rheum.* 1980;23:36-40.
- 232.-Hughes GR: Autoantibodies in lupus and its variants: Experience in 1000 patients. *Br,Med.J.* 1984;285:339-342.
- 233.-Alexander EA, Provost TT: Ro (SSA) and La (SSB) antibodies *Springer.Semin.Immunopathol.* 1981;4:253-273.
- 234.-Moutsopoulos HM, Skopouli F, Sarras AK et al: Anti-Ro (SSA) positive rheumatoid arthritis: a clinicoserological

- group of patients with high incidence of d-penicillamine side effects. *Ann.Rheum.Dis.* 1985;44:215-219.
- 235.-Consuegra GG, Mateo I, Garrido G, Linares LF, Carreira P: Características clínicas, toxicidad y respuest al tratamiento de los pacientes con artritis reumatoide y anti-Ro. XVI. Congreso Nacional de la Sociedad Española de Reumatología, p129, Libro de comunicaciones, 4-7 Junio, Vigo 1986.
- 236.-Alspaugh MA, Buchanan WW, Whaley K: Precipitating antibodies to cellular antigen in Sjögren syndrome, rheumatoid arthritis and other organ anda non-organ specific autoimmune diseases. *Ann.Rheum.Dis.* 1978;37:244-246.
- 237.-Moutsopoulos HM, Chused TM, Mann DL et al: Sjögren syndrome (Sicca syndrome): Current issues. *Ann.Intern.Med.* 1980;92:212-226.
- 238.-Balsa A, Pascual D, Vesga JC et al: Significación de los anticuerpos SSA/Ro en la artritis reumatoide. XVI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Reumatología, p92, Libro de comunicaciones, 4-7 Junio, Vigo, 1986.
- 239.- Monteagudo I, López-Longo FJ, Pereda C, et al: Síndrome de Sjögren. Estudio prospectivo en 26 pacientes. *Rev.Esp.Reumatol.* 1986;13:90-94.
- 240.-Alexander EL, Hirsch TJ, Arnett FC et al: Ro(SSA) and La(SSB) antibodies in the clinical spectrum of Sjögren's syndrome. *J.Rheumatol.* 1982;9:239-246.
- 241.-Buyon JP, Ben-Chetrit E, Karp S et al: Acquired congenital heart block. Pattern of maternal antibodies response to biochemically defined antigens of the SSA/Ro-SSB/La systems in neonatal lupus. *J.Clin.Invest.* 1989;84:627-634.
- 242.-Harley JB, Alexander EL, Bias WB et al: Anti-Ro (SSA) and anti-La (SSB) in patients with Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* 1986;29:196-206.
- 243.-Wasicek CA, Reichlin M: Clinical and Serological differences between systemic lupus erythematosus patients with antibodies to Ro versus with antibodies to Ro and La. *J.Clin.Invest.* 1982;69:835-843.
- 244.-Kassan SS, Akizuki M, Steinberg AD, Reddick RL, Chused TM: Antibodies to a soluble acidic nuclear antigen in Sjögren's syndrome. *Am.J.Med* 1977;63:328-355.
- 245.-Bell DA, Maddison PJ: Serologic subsets in systemic lupus erythamtosis. An examination of autoantibodies in

- relationship to clinical features of disease and HLA-antigens. *Arthritis Rheum.* 1980;23:1268-1273.
- 246.-Bell DA, Komar R, Chodirker WB, Bock J, Cairus E: A comparison of serologic reactivity among systemic lupus erythematosus patients with or without anti-Ro/SSA antibodies. *J.Rheumatol.* 1984;11:315-317.
- 247.-Mamula M, Fox O, Harley JB: Cross-reactivity of Ro/SSA and IgG. *Arthritis Rheum.* 1985;28(Suppl):37.
- 248.-Mamula M, Fox O, Yamagata H, Harley JB: The Ro/SSA autoantigen as an immunogen: some anti-Ro (SSA) antibodies. *Arthritis Rheum.* 1987;30:1889-1901.
- 249.-Hedgpeth MT, Boulware DW: Interstitial pneumonitis in ANA-negative SLE. A new clinical manifestation and possible association with anti-Ro (SSA) antibodies. *Arthritis Rheum.* 1988;31:545-548.
- 250.-Logar D, Kveder T, Rozman B, Dobovisek J: Possible association between anti-Ro antibodies and myocarditis or cardiac conduction defects in adults with systemic lupus erythematosus. *Ann.Rheum.Dis* 1990;49:627-629.
- 251.-Evans J, Craft JE, Klippel J, Hardin JA: Antibodies to RNP particles are useful as prognostic indicators in lupus nephritis. 51st Annual Meeting ARA, June 9-13, Washington DC, 1987.
- 252.-Maddison PJ, Reichlin M: Deposition of antibody to a soluble cytoplasmic antigen in the kidneys of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1979;22:858-863.
- 253.-Sontheimer RD, Thomas JR, Gilliam J: Subacute cutaneous lupus erythematosus. A cutaneous marker for a distinct lupus erythematosus subset. *Arch.Dermatol.* 1979;115:1409-1415.
- 254.-Weston WL, Harmon C, Peebles C et al: A serological marker of neonatal lupus erythematosus. *Br.J.Dermatol.* 1982;107:377-382.
- 255.-Scott JS, Maddison PJ, Taylor PV, Esscher E, Scott O, Skinner RP: Connective tissue disease, antibodies to ribonucleoproteins and congenital heart block. *N.Engl.J.Med.* 1983;309:209-212.
- 256.-Lockshin MD, Gibofsky A, Peebles CL et al: Neonatal lupus erythematosus with heart block: family study of a patient with anti-SSA and anti-SSB antibodies. *Arthritis Rheum.* 1983;26:210-213.
- 257.-Reichlin M, Wasicek CA: Clinical and biological significance of antibodies to Ro/SSA. *Human Pathol.*

1983;14:401-405.

- 258.-Molina R, Provost TT, Alexander EL: Two types of inflammatory vascular disease in Sjögren's syndrome. Differential association with seroreactivity to rheumatoid factor and antibodies to Ro(SSA) and with hypocomplementemia. *Arthritis Rheum.* 1985;28:1251-1258.
- 259.-Pittsley RA, Talal N: Neuromuscular complications of Sjögren syndrome. In "Vinken PJ, Bruyn GW" (eds) *Handbook of clinical neurology*, vol 39, p419, North Holland Publishing Co, Amsterdam, 1980.
- 260.-Alexander G, Provost TT, Stevens MB, Alexander EL: Sjögren syndrome: central nervous system manifestations. *Neurology* 1981;31:1391-1396.
- 261.-Skopouli FN, Andonopoulos AP, Moutsopoulos HM: Clinical implications of the presence of anti-Ro (SSA) antibodies in patients with rheumatoid arthritis. *J.Autoimmunity* 1988;3:381-388.
- 262.-Vlachoyiannopoulos PG, Zerva LV, Skopouli FN, Drosos A, Moutsopoulos Hm: D-penicillamine toxicity in Greek patients with rheumatoid arthritis: anti-Ro (SSA) antibodies and cryoglobulinemia are predictive factors. *J.Rheumatol.* 1991;18:44-49.
- 263.-Martinez-Lavin M, Vaughan JH, Tan EM: Autoantibodies and the spectrum of Sjögren's syndrome. *Ann.Intern.Med.* 1979;91:185-190.
- 264.-Elkon KB, Gharovi AE, Hughes GRV, Moutsopoulos HM: Autoantibodies in the sicca syndrome (primary Sjögren's syndrome). *Ann.Rheum.Dis.* 1984;43:243-245.
- 265.-Garcia de la Torre I, Miranda-Méndez L: Studies of antinuclear antibodies in rheumatoid arthritis. *J.Rheumatol.* 1982;9:603-606.
- 266.-Harmon C, Peebles C, Tan EM: Disease specificity of the SS-A antibodies. *Arthritis Rheum.* 1980;23:688-690.
- 267.-Smeenk R, Westgeest T, Swaak T: ANA determination: the present state of diagnostic and clinical relevance. *Scand.J.Rheumatol.* 1985;56(Suppl):78-92.
- 268.-Maddison PJ, Isenberg DA, Goulding NJ et al: Anti-La (SSB) identifies a distinctive subgroups of systemic lupus erythematosus. *Br.J.Rheumatol.* 1988;27:27-31.
- 269.-Karp SW, Roubey RAS, Winchester RJ, Buyon JP: Recognition of a 48Kd component by sera from mothers of offspring with complete congenital heart block in western-blot analysis. *Arthritis Rheum.* 1988;31(4):S66.

- 270.-Cattoggio LJ, Bernstein RM, Black CM, Hughes GRV, Maddison PJ: Serological markers in progressive systemic sclerosis: clinical correlations. *Ann.Rheum.Dis.* 1983;42:23-27.
- 271.-Winer ES, Earnshaw WC, Senécal JL, Bordwell B, Jolinston P, Rothfield NF: Clinical associations of anticentromere antibodies detected by immunoblotting in progressive systemic sclerosis: specificity and clinical correlations. *Ann.Rheum.Dis* 1989;48:992-997.
- 272.-Aeschlimann A, Meyer O, Bourgeois P et al: Anti-Scl 70 antibodies detected by immunoblotting in progressive systemic sclerosis: specificity and clinical correlations. *Ann.Rheum.Dis* 1989;48:992-997.
- 273.-Riboldi P, Asero R, Origgi L et al: Antinuclear antibodies in progressive systemic sclerosis. *Clin.Exp.Rheumatol.* 1985;3:205-211.
- 274.-Giordano M, Valentin G, Migliaresi S, Picillo U, Vatti N: Different antibodies patterns and different prognosis in patients with scleroderma with various extent of skin sclerosis. *J.Rheumatol.* 1986;13:911-916.
- 275.-Steen VD, Powell DL, Medsger TA: Clinical correlations and prognosis based on serum antibodies in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 1988;31:196-203.
- 276.-Yang DCH, Dang CV, Arnett FC: Rat liver histidyl-tRNA synthetase. Purification and inhibition by the myositis specific anti-Jo-1 autoantibodies. *Biochem.Biophys.Res.Commun* 1984;120:15-21.
- 277.-Reichlin M, Arnett FC: Multiplicity of antibodies in myositis sera. *Arthritis Rheum.* 1984;27:1150-1156.
- 278.-Reichlin M, Maddison PJ, Targoff I et al: Antibodies to a nuclear/nucleolar antigen in patients with polymyositis-overlap syndromes. *J.Clin.Immunol.* 1984;4:40-44.
- 279.-Targoff IN: Laboratory manifestations of polymyositis dermatomyositis. *Clin.Dermatol.* 1988;6:76-92.
- 280.-Arnett FC, Hirsch TJ, Blas WB et al: The Jo-1 antibody system in myositis. Relationships to clinical factors and HLA. *J.Rheumatol.* 1981;8:925-930.
- 281.-Yoshida S, Akizuki M, Mimori T, Yamagata H, Inada S, Homma M: The precipitating antibodies to an acidic nuclear protein antigen, the Jo-1, in connective tissue disorders. *Arthritis Rheum.* 1983;26:604-611.
- 282.-Schumacher HR, Schimmer B, Gordon GV, Bookspan MA, Brogadir S, Dorwart BB: Articular manifestations of

- polymyositis and dermatomyositis. Am.J.Med 1979;67:287-292.
- 283.-Oddis CV, Medsger TA, Cooperstein LA: A subluxing arthropathy associated with the anti-Jol antibody in polymyositis/dermatomyositis. Arthritis Rheum. 1990;33:1640-1645.
- 284.-Hassfeld W, Steiner G, Hartmuth K et al: Demonstration of a new antinuclear antibody (anti-RA 33) that is highly specific for rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 1989;32:1515-1520.
- 285.-Ménard HA, Boire G, López-Longo FJ, Lapointe S, Larose A: A novel antigen-antibody system restricted to rheumatoid arthritis patients: The Sa system. Arthritis Rheum. 1989;31(1):8 (abstr. A9N).
- 286.-Depres N, Ménard HA, Boire G: Characterization of two new antigen-antibody systems (Sa/Ta) in patients with rheumatoid arthritis. 54th Annual Meeting ACR. Oct 27-Nov 1, Seattle, Washington, 1990.
- 287.-Melson RD, Smith PR, Maini RN: Demonstration of an unidentified 48Kd polypeptide in circulating immune complexes in rheumatoid arthritis. Ann.Rheum.Dis. 1987;46:104-109.
- 288.-Depres N, Boire G, Ménard HA, Steiner G, Smolen J: Sa/Ta and RA-33 are unrelated autoantigens specific for rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 1991;34(9)(Suppl) S135.
- 289.-Francoeur AM: Anti-Sm and anti-U1-RNP lupus antibody fine specificities. J.Clin.Immunol. 1989;9:256-263.
- 290.-López-Longo FJ, García Monforte A, Rodríguez-Mahou M et al: Significado de los anticuerpos anti-ENA definidos mediante western-blot en lupus eritematoso sistémico. Rev.Esp.Reumatol. 1990;17(Suppl 1):18.
- 291.-Van Venrooij WJ, Wodzig KW, Habets WJ, De Rooij DJ, Van de Putte LB: Anti-56Kd: A novel frequently occurring autoantibody specificity in connective tissue disease. Clin.Exp.Rheumatol. 1986;7:277-282.